

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CARACTÈRES HISTOPATHOLOGIQUES DE LA RÉTICULOSE EXPÉRIMENTALE MORTELLE DU LAPIN PROVOQUÉE PAR LES CORYNÉBACTÉRIES ANAÉROBIES

par A.-R. PRÉVOT, J. LEVADITI, P. TARDIEUX et M^{me} O. NAZIMOFF (*).

(Institut Pasteur.
Services des Anaérobies et d'Anatomie pathologique.)

Depuis les premières observations bactério-cliniques de Masini (1913 [1]) qui avait isolé *Corynebacterium anaerobium* d'infections diverses (otites, mastoïdites, abcès pulmonaires, arthrites purulentes, septicémies); de Torrey (1916 [2]) qui avait isolé *C. lymphophilum* de ganglions prélevés dans des cas de lymphogranulomatose maligne; de Mayer (1926 [3]) qui avait isolé *C. parvum* de fièvre puerpérale, de cystites purulentes, d'infections annexielles; de Kuczinski; de Manteufel et Herzberg; d'Eggerth; d'Adamson; de Grumbach et Hotz (cités par Prévot [4]), on supposait que les Corynébactéries anaérobies pouvaient être pathogènes pour l'homme, mais on ignorait tout de leur pouvoir pathogène expérimental à l'égard des animaux de laboratoire.

L'expérience capitale de Verrier, rapportée par Prévot [4] a donné ce début de preuve : le pus d'une adénite cervicale où l'analyse bactériologique nous avait permis d'isoler *Corynebacterium liquefaciens* à l'état pur, inoculé au cobaye, a provoqué

(*) Société française de Microbiologie, séance du 6 janvier 1955.

chez cet animal une infection purulente généralisée mortelle où on a retrouvé le même germe toujours à l'état pur. Mais la culture de cet anaérobie inoculée au cobaye n'avait provoqué aucune lésion.

Les recherches bactério-cliniques récentes de Prévot et Courdurier [5], Prévot, Béal et Tardieux [6], Prévot et Huet [7], Prévot et Tardieux [8], Durand, Prévot, Renoux, Huet et Tardieux [9], Prévot, Siguier, Zara et Funck-Brentano [40], Darnis, Prévot et Rapin [41] ont attiré l'attention sur un groupe de maladies du système réticulo-endothélial où on isole par hémoculture, au moment des accès fébriles, l'une ou l'autre des espèces anaérobies du genre *Corynebacterium* (*C. avidum*, *C. parvum*, *C. granulorum*, *C. liquefaciens* ou *C. diphteroides*) : septicémies malignes, endocardites malignes, réticuloses malignes à type récurrent, lymphogranulomatoses malignes. Pour trouver une relation de cause à effet entre ces germes et ce groupe de maladies — pour lesquelles Prévot et Tardieux ont proposé le nom de Corynébactérioses — il fallait apporter la preuve du pouvoir pathogène des *Corynebacterium* anaérobies. Cette preuve fut difficile à apporter pour la raison qu'en culture pure la plupart des souches — comme presque tous les germes de la microflore anaérobie endogène — perdent tout pouvoir pathogène. Nous avons toutefois eu affaire à une souche qui a échappé à cette loi de la physiologie bactérienne : la souche 936 B de *Corynebacterium parvum*. Cette souche avait été inoculée à des lapins par voie veineuse à l'état de corps microbiens vivants, centrifugés, repris par l'eau physiologique, dans le but d'obtenir des sérums agglutinants en vue d'étudier les communautés antigéniques entre les différentes espèces du genre *Corynebacterium* [42]. Or, tous les lapins inoculés avec la souche 936 B de *Corynebacterium parvum* mouraient après la sixième ou huitième semaine et il a fallu pour obtenir un sérum anti-*parvum*, employer comme antigènes des microbes chauffés à 56° pendant une heure. La première étude histopathologique des lésions provoquées par ce germe a été publiée par Prévot, Dezeit et Levaditi [43] et cette étude préliminaire nous a incités à rechercher d'autres souches pathogènes ou à « révéler » le pouvoir pathogène cryptique de souches, apathogènes en apparence, par l'adjonction d'adrénaline. C'est ainsi que nous avons obtenu de nouvelles infections mortelles du lapin grâce aux souches 545 de *Corynebacterium parvum*, 961 de *C. avidum*, 678 de *C. diphteroides* et 758 de *C. anaerobium*.

La présente étude a trait aux contrôles histologiques effectués sur des lapins ayant succombé à la suite d'inoculation de ces différentes souches bactériennes. Aucun d'entre eux n'a été sacrifié, ce qui limite l'ensemble de nos constatations aux formes mortelles des Corynébactérioses expérimentales.

Il s'en faut que ces différentes souches de *Corynebactéries* anaérobies aient provoqué chez les lapins inoculés un seul type de maladie expérimentale. Les aspects histologiques qui en sont la traduction ont varié selon les souches inoculées et selon le mode d'introduction et l'importance de l'inoculum. De plus, la maladie expérimentale a varié d'un animal à l'autre, alors même que les souches utilisées et leur mode d'inoculation avaient été identiques.

I. — EFFETS DE LA SOUCHE *Corynebacterium parvum* 936 B.

A. FORME SEPTICÉMIQUE. — Lapin n° 201. Inoculé deux mois auparavant par voie veineuse. Mort spontanément. Examen histologique n° U. 490.

Poumons. — Lésions congestives et œdémateuses diffuses des parois alvéolaires qui rétrécissent la lumière des alvéoles et s'accompagnent souvent d'exsudat œdémateux ainsi que de tuméfaction et de multiplication des cellules alvéolaires. Dans les bronches, sérosité abondante. Présence de nombreux germes gonflés, ovales ou circulaires.

Foie. — Dans les sinusoides, de même qu'autour des espaces portes, multiplication et mobilisation des cellules de Küpffer mais de caractère relativement discret. Les cellules de plusieurs lobules hépatiques ont subi une nécrose oxyphile avec effacement des noyaux. Dans les vaisseaux, abondance de leucocytes poly- ou mononucléés. Très nombreux germes souvent gonflés et clairs situés dans les sinusoides, les vaisseaux ou les espaces de Kiernan. Ces germes sont surtout nombreux là où les cellules hépatiques ont subi la nécrose oxyphile.

Rate. — Rate d'infection aiguë : congestive, œdémateuse et hémorragique. Dilatation des sinus. Abondance de leucocytes poly- et mononucléés contenant du pigment sanguin. Les centres germinatifs sont hypertrophiés et activement macrophagiques. Abondance de germes dans les sinusoides, la pulpe rouge et les vaisseaux.

Pancréas. — Rien à signaler.

Rein. — Néphrite glomérulo-épithéliale récente avec nécrose partielle des glomérules et dégénérescence de tubes contournés. Présence de germes dans les glomérules, les vaisseaux et entre les tubes excréteurs et sécréteurs.

Cœur. — Myocarde : œdème inflammatoire interstitiel avec de nombreux germes dans les vaisseaux. Véritables colonies bactériennes dans le sang du cœur avec accumulation de leucocytes mais pas de thrombose vraie. Tuméfaction des cellules de l'endocarde, particulièrement de celles qui tapissent les valvules sigmoïdes, mais sans endocardite.

Trachée et ganglions trachéo-bronchiques. — Adénite aiguë, réactionnelle, congestive, avec de très nombreux germes surtout dans les capillaires. Le chorion de la muqueuse trachéale est riche en vaisseaux dilatés et contient de nombreux germes. Par places, ulcération de la muqueuse recouverte d'exsudat fibrineux. Dans le médiastin, hémorragies contenant de nombreux germes.

Au total : Septicémie très riche en germes qui prédominent dans les sinusoides, la pulpe rouge et les vaisseaux.

B. FORMES A PRÉDOMINANCE BRONCHO-PNEUMONIQUE. — Elles furent constatées à deux reprises différentes et se sont accompagnées de réaction du système réticulo-endothélial.

U. 583. Lapin 203. *Corynebacterium parvum* 936 B.

Poumon. — Broncho-pneumonie aiguë, suppurée, à foyers disséminés. Les bronches pleines de pus sont entourées de plages d'alvéolite purulente marginées par des zones d'alvéolite œdémateuse ou fibrino-leucocytaire. Rares formes bacillaires.

Foie. — Infiltration histio-lymphocytaire périportale peu étendue. Sinusoides dilatés œdémateux contenant en abondance des histiocytes et des polynucléaires ainsi que des plasmodies isolés, homogènes, oxyphiles, arrondis, avec de nombreux noyaux périphériques.

Rate. — Splénite aiguë avec de petits abcès à polynucléaires et des plasmodies multinucléés situés dans la pulpe rouge ou isolés dans les sinusoides.

Rein. — Néphrite glomérulo-épithéliale non spécifique.

Cœur. — Endocarde et myocarde sans anomalie histologique.

Au total : Lapin mort de broncho-pneumonie purulente. Mais on trouve dans le foie et surtout dans la rate des plasmodies à grande activité macrophagique.

U. 606. Lapin 207. *Corynebacterium parvum* 936 B.

Poumon. — Broncho-pneumonie aiguë à foyers multiples, très denses, entourés d'alvéolite œdémateuse ou catarrhale diffuse. Les bronches dilatées sont remplies de polynucléaires et cernées de micro-abcès. Absence de germes dans les différentes préparations.

Foie. — Identique au précédent. Mais l'infiltrat abondant est surtout péri-portal et constitué par des polynucléaires. Les sinusoides dilatés contiennent des plasmodies isolés.

Rate. — Splénite aiguë congestive et œdémateuse, infiltrée de cellules inflammatoires : polynucléaires, plasmocytes... mais sans plasmodies. Absence de germes.

Rein. — Néphrite glomérulo-épithéliale discrète.

Cœur. — Aucune anomalie histologique.

Au total : Lapin mort de broncho-pneumonie, mais on retrouve dans le foie des plasmodies à grande activité macrophagique.

C. FORMES A TYPE DE RÉTICULOSE DIFFUSE NON NODULAIRE A PRÉDOMINANCE PLASMODIALE. — Ces formes peuvent encore comporter des lésions broncho-pneumoniques, mais très discrètes.

U. 353. Lapin 700. *Corynebacterium parvum* 936 B.
Evolution en huit semaines.

Poumon. — Pneumopathie subaiguë assez diffuse, caractérisée par une pneumonie réticulée hypertrophique où l'on reconnaît des histiocytes, des macrophages, des lymphocytes, presque sans polynucléaires. Nombreux plasmodes multinucléés à protoplasme homogène et à noyaux périphériques. Ces lésions prédominent autour des veines pulmonaires et des axes broncho-artériels. Les endothéliums vasculaires sont tous tuméfiés et les bronches ont par place un contenu purulent. Plages d'alvéolite œdémateuse, catarrhale ou macrophagique. Il n'y a ni formation nodulaire, ni sclérose, ni nécrose. Aucun germe n'a pu être constaté dans ces lésions (pl. I, fig. 1).

Ganglions trachéo-bronchiques. — Congestion, réticulose épithélioïde disséminée des sinus marginaux, des follicules et des cordons lymphoïdes.

Foie. — Les espaces portes et les sinusoides dilatés sont infiltrés d'histiocytes, de cellules réticulées et de polynucléaires. C'est une réticulose inflammatoire interstitielle prenant par place l'aspect de nodules situés en plein parenchyme hépatique. On y retrouve des macrophages, mais surtout de très nombreux plasmodes parfois isolés. Intégrité relative des cellules hépatiques. Absence de germes visibles (pl. I, fig. 2).

Rate. — Quelques traces de follicules lymphoïdes. L'hyperplasie des cordons de Billroth comprime les sinus. Réticulose très importante de toute la pulpe rouge qui prend un aspect épithélioïde. Par place, amas de plasmodes différents des cellules de Langhans, sans épines, à noyaux irrégulièrement disposés avec souvent une vacuole contenant des débris amorphes (pl. II, fig. 3).

Rein. — Congestion glomérulaire. Néphrite interstitielle lymphomonocytaire périglomérulaire ou périvasculaire. Quelques lésions épithéliales.

Cœur. — Infiltrats interstitiels ou périvasculaires lympho-histiocytaires situés dans le myocarde sous-épicardique ou sous l'endocarde. Une valvule œdémateuse subit la dégénérescence fibrinoïde et réalise un aspect d'endocardite verruqueuse. Dans une cavité cardiaque : thrombus inflammatoire fibrineux riche en polynucléaires et en monocytes. Présence de quelques germes (pl. II, fig. 4).

Au total : Réticulose diffuse, giganto-cellulaire presque entièrement dépourvue de germes et rappelant les lésions hyperergiques ; les lésions du myocarde et de l'endocarde réalisent en particulier des images de ce type.

De telles lésions ne sont pas constantes. Ainsi le lapin n° 211, mort dans les mêmes conditions que le précédent, fut l'objet du compte rendu suivant.

U. 597. Lapin 211. *Corynebacterium parvum* 936 B.

Poumon. — Aucune anomalie de la trame ou des axes broncho-artériels. Hyperplasie des amas lymphoïdes juxta-vasculaires.

Foie. — Hyperplasie histio-lymphocytaire périportale envoyant des prolongements interlobulaires sans sclérose ni atteinte des lobules ou des veines centro-lobulaires. Dégénérescence granuleuse de la plupart des cellules hépatiques. Aucune altération des sinusoides et absence de plasmodes.

Rate. — Aucune anomalie histologique sauf une réticulose périfolliculaire et une hyperplasie des centres germinatifs. Absence de plasmodes.

Pancréas. — Normal.

Rein. — Histologiquement normal.

Cœur. — Aucune anomalie du myocarde ou de l'endocarde.

En résumé : Hyperplasie réticulo-endothéliale discrète du foie, de la rate et des amas lymphoïdes pulmonaires. Aucune lésion histologique de ces différents organes ne permet d'expliquer la mort de cet animal.

D. FORMES A TYPE DE RÉTICULOSE DIFFUSE NON NODULAIRE A PRÉDOMINANCE PLASMODIALE MAIS PROVOQUÉE PAR DES GERMES MORTS. — Les lésions sont apparues à la suite d'injections intraveineuses répétées de germes chauffés à 60° pendant une heure. Le lapin est mort au bout de deux mois.

U. 777. Lapin 213. *C. parvum* 936 B.

Poumon. — Cloisons alvéolaires épaissies diminuant la lumière des alvéoles, absence de réaction exsudative, capillaires dilatés contenant des polynucléaires et des monocytes diapédétiques. Nombreuses cellules éosinophiles à granulations discoïdes. Grandes cellules ovalaires à noyaux multiples ou plurilobés, à protoplasme homogène ou vacuolaire. Certaines cellules à noyaux plurilobés sont des mégacaryocytes qui, on le sait, apparaissent fréquemment chez le lapin au cours d'inflammations pulmonaires subaiguës (pl. III, fig. 6).

Foie. — Traînées périlobulaires formées d'histiocytes et de lymphocytes avec quelques polynucléaires. Réticulose des sinusoides où l'on retrouve des cellules rondes, petites, multinucléées entre les travées de Remack. Là encore, activité et prolifération réticulo-endothéliale sans nécrose. Pas de germes visibles.

Rate. — Hyperplasie réticulaire et macrophagique au niveau des follicules de Malpighi. Pas de germes visibles.

Rein. — Glomérulite à son stade initial. Infiltrats cellulaires et plasmodes dans le tissu interstitiel.

Cœur. — Absence de lésion des trois tuniques.

Au total : Réticulose de même type mais moins intense que U. 353.

Un dernier document a pu être obtenu à propos d'un lapin inoculé toujours avec la souche de *Corynebacterium parvum* 936 B

introduite en 8 injections intraveineuses espacées sur une durée de deux mois (une injection par semaine). Dernière injection faite le 28 mai 1954, la mort a eu lieu vingt-deux jours plus tard. Ce lapin ne présente aucune lésion pouvant expliquer la mort et le compte rendu, sensiblement de même type que celui du lapin 211, inoculé dans les mêmes conditions, avec des germes vivants, n'a pas paru mériter d'être reproduit ici.

II. — EFFETS D'UNE AUTRE SOUCHE DE *Corynebacterium parvum*.

Le seul lapin que nous ayons étudié a été inoculé avec *Corynebacterium parvum* n° 545. Ce lapin avait été l'objet, comme les lapins précédents, d'injections répétées de germes tués par chauffage à 56° pendant une heure. Les constatations histologiques ont été dans l'ensemble identiques à celles du lapin n° 213 (U 777).

U. 778. Lapin 214. *C. parvum* 545.

Poumon. — Polynucléaires nombreux dans les vaisseaux, mais peu diapédétiques. Épaississement des cloisons alvéolaires par accumulation de cellules histiocytaïres ; quelques réticulocytes à 3 ou 4 noyaux ; abondance de polynucléaires à grains éosinophiles discoïdes.

Foie. — Hypertrophie modérée des cellules de Küpffer. Infiltration histiocytaire périportale. Présence de quelques plasmodes dans les sinusoides.

Rate. — Congestion et réticulose pulpaire effaçant les sinus. Présence de plasmodes géants.

Rein. — Glomérulite modérée.

Cœur. — Atteinte valvulaire avec petite plage de nécrose fibrinoïde. Aucun germe dans ces lésions.

III. — ALTÉRATIONS HISTO-PATHOLOGIQUES PROVOQUÉES PAR *Corynebacterium anaerobium* OU PAR *C. avidum*.

A. *Corynebacterium anaerobium* souche 678 et souche 758.

La souche n° 678 a été inoculée à un lapin qui a succombé après plusieurs semaines à une forme septicémique avec endocardite et myocardite aiguës contenant de nombreux germes (Examen U. 428).

Foie. — Infiltration des espaces portes et des sinusoides par des monocytes, des lymphocytes et des polynucléaires altérés. Foie infectieux non spécifique. Présence de très nombreux germes (pl. III, fig. 5).

Rate. — Splénite aiguë, congestive et oedémateuse. La pulpe rouge et les sinus sont gorgés de polynucléaires et de cellules polymorphes. Pigment sanguin très abondant.

Cœur. — Sur les bords de l'endocarde, amas de polynucléaires altérés et caillot fibrino-leucocytaire. L'endocarde forme de petites végétations verruqueuses sous lesquelles on observe des suffusions hémorragiques. Myocardite interstitielle subaiguë à polynucléaires.

Ces différents organes contiennent de très nombreux germes étroits et courts, intra- ou extra-cellulaires, accompagnés de granules rose pâle, homogènes, en rapport avec des formes de lyse. On les retrouve surtout dans les vaisseaux et dans le caillot intra-cardiaque.

Au total : aspect d'infection aiguë septicémique avec endomyocardite.

La souche 758 a été inoculée au lapin 669 qui est mort après plusieurs semaines. Le compte rendu histologique est donné en entier afin de montrer l'identité des lésions avec celles qui ont été provoquées avec *Corynebacterium parvum*.

U. 391. Lapin n° 669. *Corynebacterium anaerobium* 758 pathogène.

Poumon. — Pneumopathie diffuse. Hypertrophie des parois alvéolaires infiltrées de cellules inflammatoires diverses : macrophages, histiocytes, quelques polynucléaires éosinophiles ou non. Les cellules réticulées sont souvent soudées sans limites nettes, formant de véritables plages plasmodiales à noyaux irrégulièrement disposés. Tuméfaction et prolifération des endothéliums, fibrose et œdème de l'adventice des vaisseaux.

Foie. — Hépatite interstitielle surtout périportale envoyant des prolongements interlobulaires. Importante réticulose des sinusoides infiltrés également de lymphocytes. Très nombreux plasmodies multinucléés, circulaires, isolés et situés au contact de cellules hépatiques saines.

Rate. — Réticulose diffuse autour des follicules et dans les cordons pulpaire très épaissis. Plasmodies peu nombreux. Pigment sanguin abondant. Rate hyperplasique avec importante réticulose.

Rein. — Glomérulo-néphrite subaiguë.

Cœur. — Dans le myocarde, nombreux infiltrats histiocytaires et leucocytaires interstitiels, le plus souvent périvasculaires. Ils rappellent les nodules d'Aschoff par leur configuration et leur topographie. Absence de germes dans ces différents organes.

Au total : Réticulose diffuse histiocytaire et plasmodiale, accompagnée d'infiltrats interstitiels dans le myocarde. Absence de germes visibles. Le tout évoque une inflammation hyperergique avec disparition des germes qui l'ont provoquée.

B. Lésions provoquées par *Corynebacterium avidum* n° 961.

Un premier lapin inoculé (n° 208, examen U. 879) est mort au cours d'une septicopyohémie mortelle où l'on a retrouvé des

lésions de broncho-pneumonie, de pleurésie, de péricardite fibrino-purulente.

Le second lapin (n° 209, examen U 853) avait reçu comme le précédent 8 injections intraveineuses effectuées toutes les semaines, la mort ayant eu lieu vingt-deux jours après la dernière injection. Les lésions des différents organes sont ici discrètes. Tout au plus note-t-on quelques nodules lymphoïdes péribronchiques.

Ce résultat s'apparente donc aux constatations faites dans des circonstances semblables avec la souche *C. parvum* 936 B (lapin n° 204, examen U. 852).

Tels sont les faits histo-pathologiques qui ressortent du contrôle des organes des lapins auxquels ont été injectées par voie veineuse diverses souches de Corynébactéries anaérobies (1) :

1° Ces germes déterminent des septicémies, des septico-pyohémies, des broncho-pneumonies : toutes formes d'infections aiguës dans lesquelles les Corynébactéries anaérobies se sont comportées comme étant des bactéries fortement pathogènes, déclenchant des maladies mortelles et s'accompagnant souvent d'endocardite maligne.

2° Des formes, également mortelles, mais d'évolution plus prolongée. Que ces formes aient été associées aux formes précédentes, en particulier aux broncho-pneumonies, ou qu'elles aient été constatées isolément, elles peuvent être définies au moins comme étant des réticuloses diffuses, non nodulaires, à prédominance plasmodiale. Leur analogie avec des altérations de nature hyperergique est encore renforcée par l'existence des lésions endocarditiques accompagnées de petites plages de dégénérescence fibrinoïde et de nodules d'infiltration monocytaire interstitiels du myocarde.

Il est certain que ces lésions sont fort différentes de celles observées au cours des réticuloses malignes de l'homme, mais elles n'en

(1) Des contrôles histologiques ont été effectués également pour des cobayes inoculés avec certaines de ces Corynébactéries. Elles se sont révélées être également pathogènes pour le cobaye, lorsqu'elles étaient mélangées à de l'adrénaline au moment de l'injection.

Un cobaye, objet de l'examen U. 790, avait reçu une souche de *C. parvum*. Cet animal a succombé en quatre semaines à la suite d'une broncho-pneumonie purulente à foyers disséminés dans lesquels on constatait de nombreux germes analogues à ceux du lapin 201.

Un second cobaye inoculé avec *C. anaerobium* 1065 (examen U. 719) a succombé à une forme pyohémique : pleurésie et péricardite purulentes riches en germes, cela en quatre jours.

Ni chez l'un, ni chez l'autre de ces cobayes n'ont été constatées ces lésions de réticulose plasmodiale observées chez le lapin.

sont pas moins également très particulières et prouvent le caractère spécial des infections provoquées chez certains lapins avec ces souches de *Corynebactéries*.

CONCLUSIONS.

Les *Corynebactéries* anaérobies déterminent dans la plupart des cas la mort des lapins inoculés par voie veineuse, mais il s'en faut que la maladie expérimentale qu'elles provoquent soit toujours identique à elle-même. Les lésions histo-pathologiques que l'on constate chez ces animaux montrent qu'il s'agit de broncho-pneumonies, de septicémies, de septicopyohémies au cours desquelles on est frappé par la fréquence des altérations endocarditiques qui réalisent le plus souvent des images d'endocardite maligne. Les lésions provoquées dans d'autres cas sont parfois de type très particulier : affectant l'allure d'une réticulose diffuse, non nodulaire, à prédominance plasmodiale et s'accompagnant également de lésions endocarditiques. Ces lésions dans lesquelles les germes ont disparu évoquent les inflammations de type hyperergique (2).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MASSINI. *Z. ges. exp. Med.*, 1913, **2**, 81.
- [2] TORREY. *J. med. Res.*, 1916, **34**, 65.
- [3] MAYER. *Cbl. Bakt. I.*, 1926, **98**, 370.
- [4] A.-R. PRÉVOT. *Symp. Actinomycétales*, Rome, 1953, 40.
- [5] A.-R. PRÉVOT et J. COURDURIER. *Ces Annales*, 1949, **76**, 232.
- [6] A.-R. PRÉVOT, G.-J. BÉAL et P. TARDIEUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 763.
- [7] A.-R. PRÉVOT et M. HUET. *Ces Annales*, 1951, **80**, 94.
- [8] A.-R. PRÉVOT et P. TARDIEUX. *Ces Annales*, 1953, **84**, 879.
- [9] P. DURAND, A.-R. PRÉVOT, G. RENOUX, M. HUET et P. TARDIEUX. *Sang* (à paraître).
- [10] A.-R. PRÉVOT, F. SIGUIER, M. ZARA et J.-L. FUNCK-BRENTANO. *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1954, **70**, 344.
- [11] F. DARNIS, A.-R. PRÉVOT et M. RAPIN. *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1954, **70**, 341.
- [12] G. LINZENMEIER. *Ces Annales*, 1954, **87**, 572.
- [13] A.-R. PRÉVOT, G. DEZEST et J. LEVADITI. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1937.

(2) Après la rédaction et l'impression de cet article, nous avons eu connaissance de l'ouvrage récent de M. Guérin : « Tumeurs spontanées des animaux de laboratoire » (A. Legrand, édit., Paris, 1954), dans lequel se trouve décrite une réticulo-granulomatose plasmodiale spontanée du rat, d'étiologie inconnue et dont le tableau histopathologique est du même type que celui que nous décrivons, à ceci près qu'il ne fait pas allusion aux lésions endocarditiques.

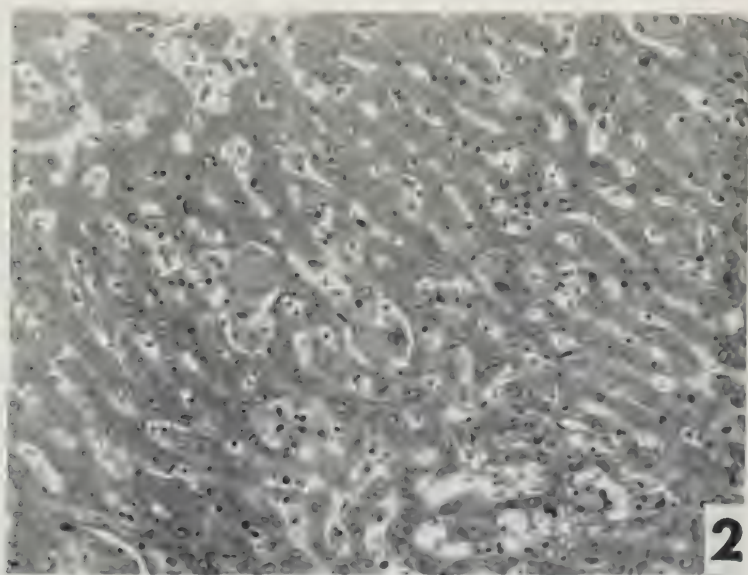
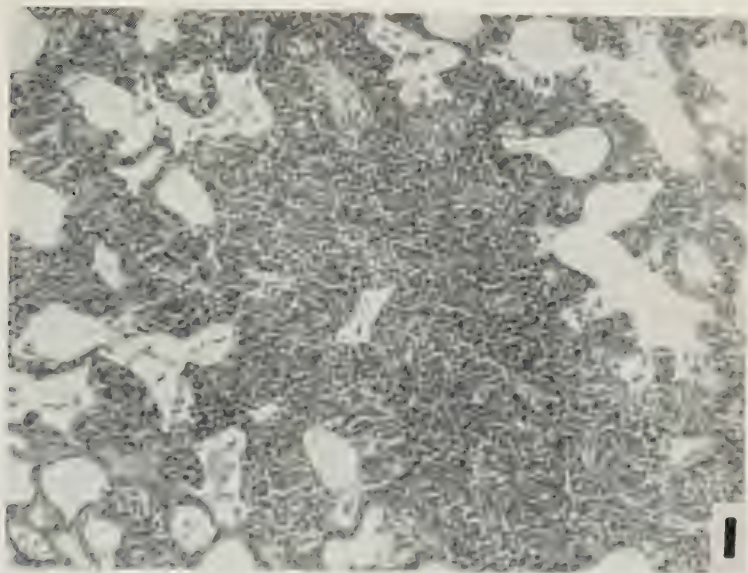


PLANCHE I.

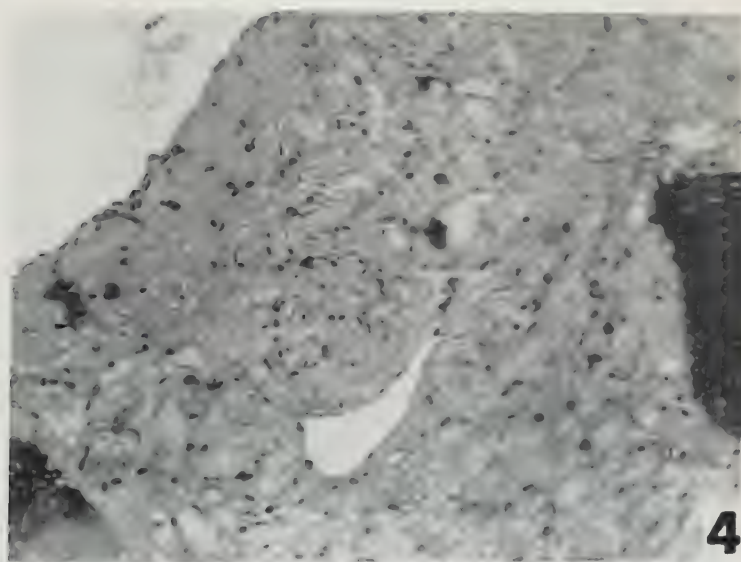
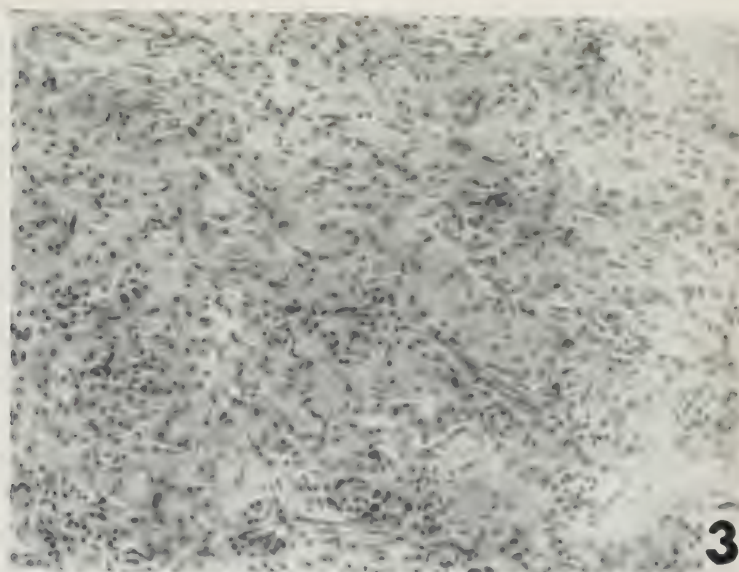


PLANCHE II.

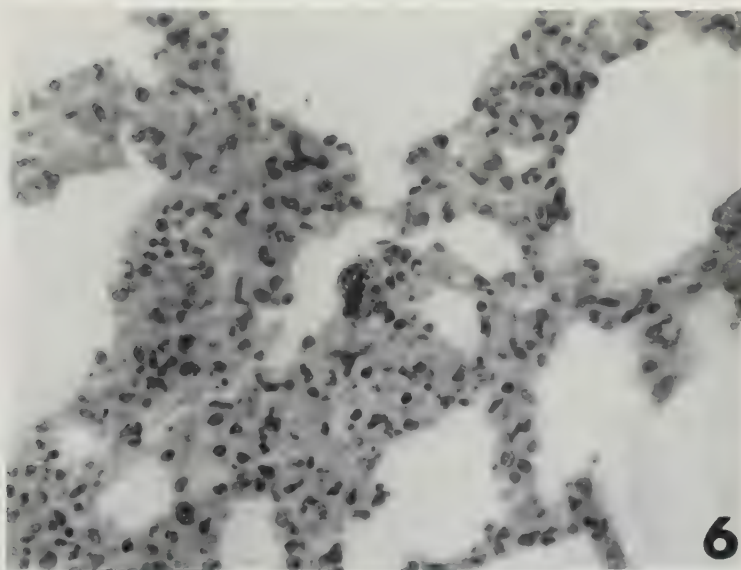
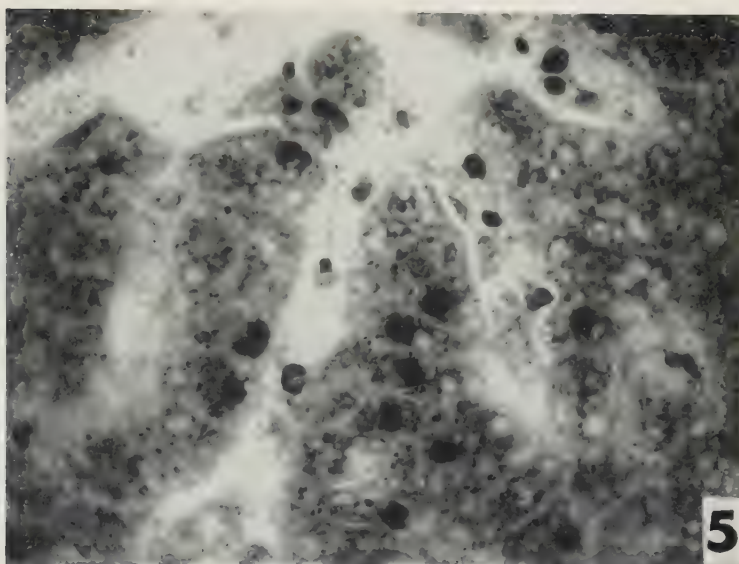


PLANCHE III.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE I : FIG. 1. — Poumon. Pneumopathie subaiguë avec pneumonie réticulée hypertrophique et réaction plasmodiale intense. Grossissement : oculaire 6 ; objectif 10x. Grandissement 87. Coloration : hématoéine-éosine. Ecran Wratten n° 58. Examen n° U 353.

FIG. 2. — Foie. Sinusoïdes dilatés infiltrés d'histiocytes, de cellules réticulées et de plasmodes parfois isolés. Grossissement : oculaire 6 ; objectif 26x. Grandissement 200. Même coloration que la figure 1. Examen n° U 353.

PLANCHE II : FIG. 3. — Rate. Réticulose de la pulpe rouge avec de nombreux plasmodes contenant des débris amorphes. Mêmes caractéristiques que figure 2.

FIG. 4. — Endocarde. Endocardite verruqueuse avec plage de dégénérescence fibrinoïde. Mêmes caractéristiques que figure 2.

PLANCHE III : FIG. 5. — Foie. Infiltration des sinusoïdes dilatés par des cellules inflammatoires diverses. Abondance de germes affirmant la septicémie. Grossissement : oculaire 6 ; objectif 80x. Grandissement 660.

FIG. 6. — Poumon. Réticulose macrophagique des parois alvéolaires avec présence d'un myélopaxe. Grossissement : oculaire 6 ; objectif 40x. Grandissement 380. Coloration hématoéine-éosine. Ecran Wratten n° 58.

Les photomicrographies ont été prises par M. J. Crezlak au Service photographique de l'Institut Pasteur (M. P. Manigault, Chef de Service). Nous remercions très vivement ce Service de sa collaboration.

MÉTHODES
DE PRÉPARATION D'EXTRAITS LEUCOCYTAIRES
ET DE SÉRUMS ANTI-LEUCOCYTAIRES
SUSCEPTIBLES D'ÊTRE UTILISÉS
POUR DES ÉTUDES IMMUNOCHIMIQUES

par P. GRABAR, M. SELIGMANN (*) et JEAN BERNARD (**),
avec l'aide technique de M^{lle} BORISEVITCH (***).

*(Service de Chimie microbienne [P. GRABAR],
Institut Pasteur, Paris,
et Centre d'Etude et de Traitement des leucémies,
Hôpital des Enfants-Malades [J. BERNARD].)*

L'application de méthodes immunochimiques, et, en particulier, de la technique d'Ouchterlony, à l'étude de la constitution antigénique des leucocytes normaux et leucémiques implique la nécessité de disposer d'extraits contenant en solution des antigènes leucocytaires, et de sérums anti-leucocytaires riches en anticorps précipitants. La mise au point de techniques permettant l'obtention d'extraits leucocytaires répondant aux conditions requises pour nos recherches a posé de très difficiles problèmes qui ne sont pas encore tous résolus.

La première étape consiste à préparer des suspensions, très riches et aussi pures que possible, de leucocytes bien lavés (et en particulier débarrassés de tout constituant sérique). La deuxième étape consiste à lyser ces leucocytes, par une méthode évitant toute dégradation de leurs constituants, puis à conserver les lysats ainsi obtenus dans de bonnes conditions.

I. — PRÉPARATION DE SUSPENSIONS LEUCOCYTAIRES.

Le but que nous nous étions initialement assigné était d'obtenir une suspension très concentrée de leucocytes non altérés, privée de tout constituant protidique du sérum, de globules rouges et

(*) Boursier de la Fondation Lady Tata.

(**) Manuscrit reçu le 15 janvier 1955.

(***) Travail effectué avec l'aide de la Fondation Waksman.

de plaquettes. Mais la séparation des leucocytes pose des problèmes très délicats et toutes ces qualités sont difficilement compatibles : dès que l'on tente d'obtenir une suspension leucocytaire dans un état voisin de la pureté, on est amené à employer des techniques trop brutales et on recueille des cellules détériorées. De plus, lorsque la suspension est destinée à des études immuno-chimiques, il ne suffit pas d'obtenir des leucocytes morphologiquement intacts : il ne faut pas perdre de vue que ces cellules ont une activité métabolique propre et qu'elles contiennent des enzymes autolytiques. Il est nécessaire, pour de telles études, que les leucocytes obtenus conservent, sinon toutes leurs propriétés physiologiques, du moins tous leurs constituants antigéniques. Nous avons donc été amenés à sacrifier le rendement à la qualité.

Diverses méthodes de séparation des leucocytes ont été préconisées. Certains auteurs ont pu tirer parti de l'*adhésivité* particulière des globules blancs à des parois de verre [1]. Mais ce procédé ne permet de recueillir que des quantités minimales de leucocytes. Il en est de même des méthodes fondées sur la *mobilité électrophorétique* des leucocytes dont la vitesse de migration est, comme l'a montré Robineaux [2], différente de celle des hématies.

D'autres procédés fréquemment employés consistent à *lyser les hématies* par addition au sang d'eau alcoolisée (Fiessinger), d'un mélange d'acide tartrique et d'acide acétique [3], ou de lyso-lécithine et de gramicidine [4]. Mais d'une part tous ces produits sont nocifs pour les leucocytes et d'autre part ils n'éliminent pas du culot leucocytaire le stroma des hématies.

Toutes les autres méthodes reposent sur la différence de poids spécifique des différents éléments figurés du sang dont les valeurs respectives sont, d'après Philips et van Slyke :

Hématies	d = 1 090 à 1 088
Leucocytes	d = 1 079 à 1 065
Plaquettes	d = 1 030

Les méthodes dites de *flottaison* consistent à utiliser des solutions de densité intermédiaire entre celle des hématies et celle des globules blancs, à base de gomme acacia [5] ou de sérum-albumine bovine [6]. Ces techniques exigent des centrifugations trop longues et ne permettent de se débarrasser entièrement ni du sérum, ni des plaquettes.

Les méthodes les plus habituellement utilisées comportent soit une sédimentation accélérée du sang, soit des centrifugations, soit l'association de ces deux procédés.

L'accélération de la *sédimentation* des hématies puis des leucocytes peut être réalisée par l'adjonction, à du sang prélevé sur anticoagulants, de gomme arabique [7], de fibrinogène [8] ou de

la fraction I de Cohn [9], surtout de polyvinylpyrrolidone [40, 41] ou de dextran [42]. Mais la sédimentation employée isolément ne permet de recueillir que des leucocytes en milieu plasmatique, mêlés aux plaquettes et à un nombre encore important d'hématies.

La *centrifugation* du sang permet la formation d'un « tapis » leucocyto-plaquettaire recouvrant les hématies. Maupin et Chary [43] réunissent de tels « tapis » provenant de plusieurs flacons de sang et soumettent cette suspension à une nouvelle centrifugation. Dans la couche leucocytaire ainsi formée, ils recueillent 1 million de globules blancs/mm³, pour 300 000 globules rouges et 15 millions de plaquettes. Bessis, par l'emploi de tubes à centrifugation étranglés à leur partie moyenne [44], réalise des progrès incontestables dans l'isolement des leucocytes, mais cette technique ne permet pas d'en obtenir de grandes quantités. Les conditions optima de centrifugation ont théoriquement été réalisées dans l'appareil spécialement conçu à cet effet par l'école de Cohn à Boston [42]. Les techniques que nous avons utilisées sont moins complexes.

1° TECHNIQUES UTILISÉES.

a) *Leucocytes normaux*. — Il était indispensable, pour entreprendre nos études immuno-chimiques, de posséder des quantités importantes de suspensions très riches en leucocytes normaux. Ce fait impliquait la nécessité de nous adresser à un centre disposant de nombreux donneurs, en l'occurrence l'Etablissement central de Transfusion de l'Armée (Directeur : médecin colonel Julliard). Le médecin commandant Maupin (1) y a mis au point la technique suivante [45] : on centrifuge pendant treize minutes à une vitesse de 2 500 tours/minute les « tapis » leucocyto-plaquettaires réunis à partir de 10 à 15 flacons de sang citraté. La crème leucocytaire ainsi recueillie — et dont nous avons donné plus haut les caractéristiques — est soumise à trois centrifugations-lavages successives, brèves et à vitesse réduite (accélération maxima de 300 g). La première de ces centrifugations se fait en présence de polyvinylpyrrolidone à raison de quatre parties de Subtosan à 2 p. 100 pour une partie de crème leucocytaire. Les hématies et une proportion importante des plaquettes demeurent dans les liquides surnageants qui sont soigneusement pipetés.

b) *Leucocytes leucémiques*. — Les malades dont le sang fut prélevé avant tout traitement pour effectuer la séparation des leucocytes étaient tous atteints d'une forme particulièrement

(1) Nous remercions très vivement le Dr Maupin qui a eu la grande obligeance de nous apporter une aide efficace pour cette partie de nos recherches.

hyperleucocytaire (plus de 150 000 globules blancs/mm³) de leucémie :

leucémies myéloïdes chroniques dont la formule sanguine ne comportait pratiquement que des éléments granuleux à leurs divers stades de maturation ;

leucémies lymphoïdes chroniques avec moins de 2 p. 100 d'éléments non lymphocytaires ;

leucémies aiguës dont le sang contenait au moins 90 à 95 p. 100 de leucoblastes typiques.

La séparation comporte trois temps : sédimentation accélérée par le polyvinylpyrrolidone ; chasse de bas en haut des couches superposées ; centrifugations-lavages.

Sédimentation : On recueille aseptiquement sur héparine (10 mg pour 100 ml de sang), 300 ml de sang dans un récipient soigneusement siliconé (2), de forme conique et spécialement conçu pour permettre la sédimentation et la chasse dans de bonnes conditions (fig. 1).

Immédiatement après le prélèvement, on mélange le sang à 250 ml d'une solution de polyvinylpyrrolidone (Subtosan) en milieu conservateur. Dans cette solution, on ajoute du glucose à concentration finale de 3 g p. 1 000 pour freiner le catabolisme des leucocytes au cours de la sédimentation.

La concentration optima en Subtosan est variable, non seulement d'un type de leucémie à un autre, mais encore d'un malade à l'autre. C'est pourquoi il est préférable, si la chose est possible, de déterminer préalablement dans de petites éprouvettes graduées quelle est la concentration en Subtosan qui permet d'obtenir la sédimentation la plus rapide et la plus nette du sang dont on veut séparer les leucocytes. Cette concentration optima varie entre 1 p. 100 et 3 p. 100 (une partie de cette solution pour une partie de sang).

(2) Pour siliconer ce récipient, nous employons un mélange à parties égales des vernis DC 802 et DC 804 de Saint-Gobain ; le flacon doit avoir été préalablement décapé par le mélange sulfochromique puis rincé et séché.

Après application d'une mince couche de silicone, également répartie sur la surface du récipient, on fait sécher au four Pasteur à 200° C pendant deux heures.

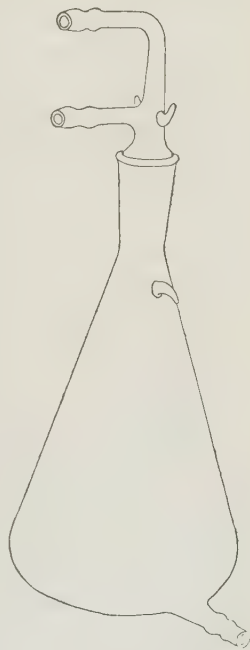


FIG. 1.

L'emploi de Dextran à concentration finale de 0,9 p. 100 permet d'obtenir une sédimentation un peu plus rapide.

On laisse sédimenter à la température du laboratoire pendant deux à trois heures. Au terme de ce délai :

pour les leucémies myéloïdes chroniques, on observe la formation, au-dessus des globules rouges, d'une couche leucocytaire crémeuse à limites nettes au-dessus de laquelle se trouvent les plaquettes, puis le mélange plasma + solution de Subtosan ;

pour les leucémies lymphoïdes chroniques et les leucémies aiguës, on n'obtient pas, en règle, une sédimentation aussi nette des leucocytes, qui sont présents à la partie inférieure de la phase liquide qui surmonte la couche des hématies.

Chasse : Par une tubulure latérale située à la partie inférieure du récipient (fig. 1), on fait pénétrer une solution glucosée dense ($d = 1200$). Le débit, qui doit être très lent au début, sera progressivement accéléré. Il faut, bien entendu, éviter le passage de toute bulle d'air. Les couches superposées sont ainsi progressivement refoulées vers l'extrémité supérieure du récipient où un bouchon à double tubulure latérale permet de les recueillir au moment propice. On recueille ainsi dans des tubes à centrifuger, siliconés et stériles, soit la crème leucocytaire, soit la phase liquide contenant en suspension la majorité des leucocytes.

Centrifugations-lavages : C'est un temps indispensable, non seulement pour poursuivre la séparation des leucocytes des autres éléments figurés, mais surtout pour éliminer toute trace de plasma de la suspension leucocytaire. Cependant, l'expérience montre que, malgré l'inconvénient d'un rendement faible, il faut réduire au strict minimum le nombre et la vitesse de ces centrifugations.

Nous procédons à trois centrifugations successives : la première d'entre elles porte, selon le type de leucémie, soit sur la phase liquide riche en leucocytes, soit sur la crème leucocytaire recueillie et diluée dans une solution contenant du Subtosan à concentration finale de 1 p. 100 ; cette adjonction de Subtosan permet de bien séparer les leucocytes granuleux des hématies.

Les temps de centrifugation adoptés sont très brefs :

Pour la première centrifugation : trente secondes à 2 000 tours/minute et quinze secondes à 1 000 tours/minute. Pour la deuxième centrifugation : vingt secondes à 2 000 tours/minute et quinze secondes à 1 000 tours/minute. Pour la dernière centrifugation : dix secondes à 2 000 tours/minute et quinze secondes à 1 000 tours/minute.

Ces lavages doivent se faire non pas avec du sérum physiologique, mais avec une solution « conservatrice » sur laquelle nous reviendrons. On sépare les culots par un pipetage très

minutieux et les surnageants sont recueillis pour contrôler par des méthodes immuno-chimiques la qualité des lavages, en ce qui concerne les constituants du sérum. On en vérifie également le pH.

On note l'aspect des cellules après la troisième centrifugation, sur un frottis coloré par le May-Grunwald-Giemsa. Le culot final est dilué dans la solution « conservatrice » en ajustant à la concentration désirée (100 à 200 000 leucocytes par millimètre cube) et on détermine le pourcentage d'hématies et de plaquettes présentes dans cette suspension.

Tant pour les leucocytes normaux que pour les leucocytes leucémiques, toutes les opérations doivent se dérouler de façon parfaitement stérile et avec un matériel soigneusement siliconé. Le problème des lavages est particulièrement important : dès que les leucocytes ont été séparés de leur plasma, il faut que le liquide dans lequel on les met en suspension réponde à un certain nombre de conditions nécessaires à leur conservation. L'eau physiologique est nocive pour les leucocytes. Tenant compte de l'expérience de Tullis [16], nous avons adopté pour notre solution « conservatrice » la formule suivante :

NaCl	7,65 g
KCl	0,20 g
CH ₃ CO ₂ Na	1,50 g
PO ₄ H ₂ Na	0,05 g
PO ₄ H ₂ K	0,10 g
CO ₃ HNa	0,70 g
Glucose	1,0 g
Acide ascorbique	0,003 g
Rouge phénol	traces
Eau bidistillée	q. s. p. 1 000 ml
pH = 7,3	$\Delta = -0,56^{\circ} \text{C.}$

Elle présente certains avantages : 1° le glucose ralentit le catabolisme propre des leucocytes ; 2° la constance du pH est assurée par les carbonates et phosphates et tout virage de l'indicateur permet de constater immédiatement une variation du pH ; 3° la présence de cations divalents (Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺) est évitée afin de diminuer l'activation de certains enzymes endocellulaires ; 4° le point cryoscopique est égal à celui du sérum ; 5° l'adjonction d'acétate de Na permet de diminuer la tendance des leucocytes à adhérer aux parois et l'adjonction d'acide ascorbique serait utile pour préserver la surface des leucocytes.

Si cette solution est utilisée dans le but de conserver des leucocytes à la glacière, il convient d'ajouter du polyvinylpyrrolidone de manière à obtenir une viscosité identique à celle du plasma, soit à une concentration finale de 3 p. 100. Mais, pour notre travail, la suspension leucocytaire est destinée à être lysée par les ultrasons ; si le milieu est visqueux, le temps nécessaire à l'action destructrice des ultrasons est beaucoup plus long. C'est pourquoi notre solution ne contient pas de Subtosan.

2° RÉSULTATS. — Par ces techniques, nous obtenons des suspensions riches en leucocytes, pratiquement débarrassées de tout constituant sérique.

Nous avons vérifié la qualité des lavages par la méthode d'Ouchterlony [47] à l'aide de sérums anti-constituants du sérum humain normal : sérum de cheval anti-sérum humain total, sérum de cheval anti-albumine, sérum d'âne anti- γ -globulines. Nous comparons, sur une même plaque de gélose, les réactions avec ces anti-sérums des surnageants des trois lavages successifs à des dilutions variées, du sérum et des lysats obtenus après la séparation correspondante de leucocytes. Nous avons ainsi pu constater que, si les leucocytes ont été correctement lavés, le lysat correspondant ne contient en règle aucun des principaux constituants protidiques du sérum décelables par les techniques de précipitation spécifique en milieu gélifié.

Les photographies des figures 2 et 3, où l'immunsérum utilisé est un sérum de cheval anti-sérum humain total (ChASH), illustrent deux de ces expériences. Les deux photographies de la figure 2 permettent la constatation suivante : alors que le surnageant prélevé lors du premier lavage (I) contient tous les constituants du sérum et que le liquide du deuxième lavage (II) contient encore sérum-albumine et γ -globuline, ni le troisième surnageant (III), ni le lysat (LA II) ne réagissent avec l'anti-sérum. À l'opposé, les deux photographies de la figure 3 témoignent d'un lavage insuffisant : les trois surnageants successifs contiennent des constituants sériques ; le lysat obtenu (Ly 5) en contient également.

Les lysats débarrassés de toute protéine sérique contiennent des constituants spécifiquement leucocytaires, alors qu'aucun des surnageants ne renferme ces constituants [48].

La contamination par les hématies est minime, de l'ordre d'un globule rouge pour 200 à 500 globules blancs après séparation des sangs normaux ou de leucémie myéloïde, de l'ordre d'un globule rouge pour 100 éléments blancs dans les suspensions de leucoblastes ; les lymphocytes de leucémie lymphoïde chronique sont plus difficiles à séparer des hématies : il persiste un globule rouge pour 30 à 60 lymphocytes. La contamination par les plaquettes est plus importante : 0,5 à 3 plaquettes par leucocyte normal ; une plaquette pour 2 à 5 leucocytes de leucémies chroniques ; une plaquette pour 5 à 15 leucoblastes. L'état des leucocytes est en règle satisfaisant.

3° CRITIQUE DE CES TECHNIQUES. — Ces techniques, quoique satisfaisantes, sont encore imparfaites. Les points suivants méritent d'être soulignés :

a) Les méthodes utilisées pour la séparation des leucocytes normaux d'une part, leucémiques d'autre part sont voisines, mais

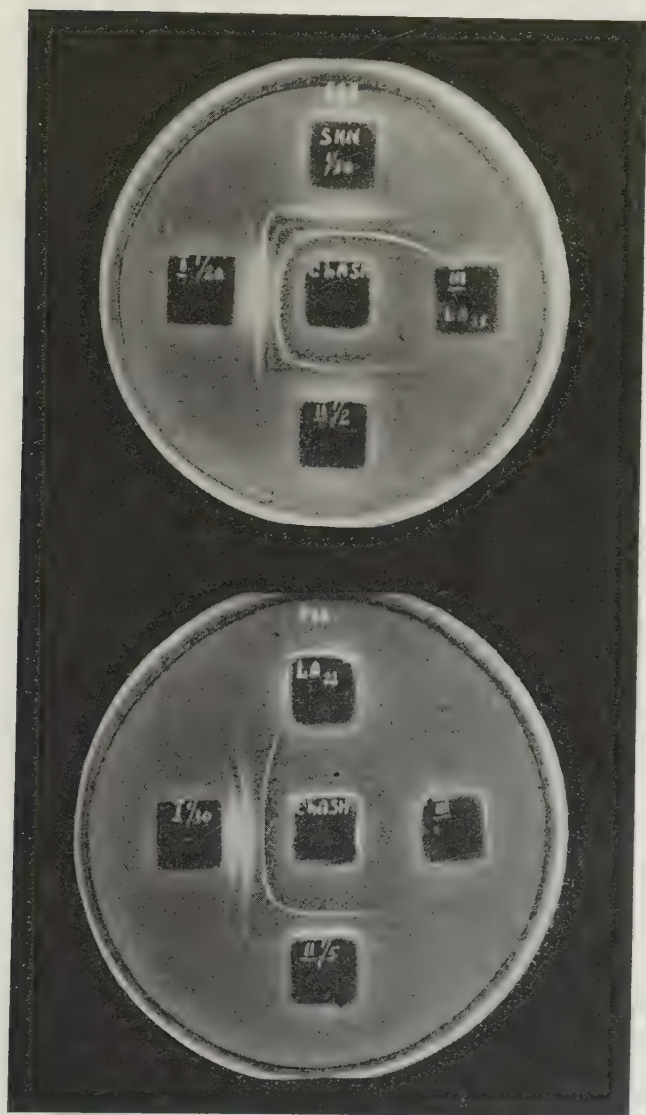


FIG. 2.

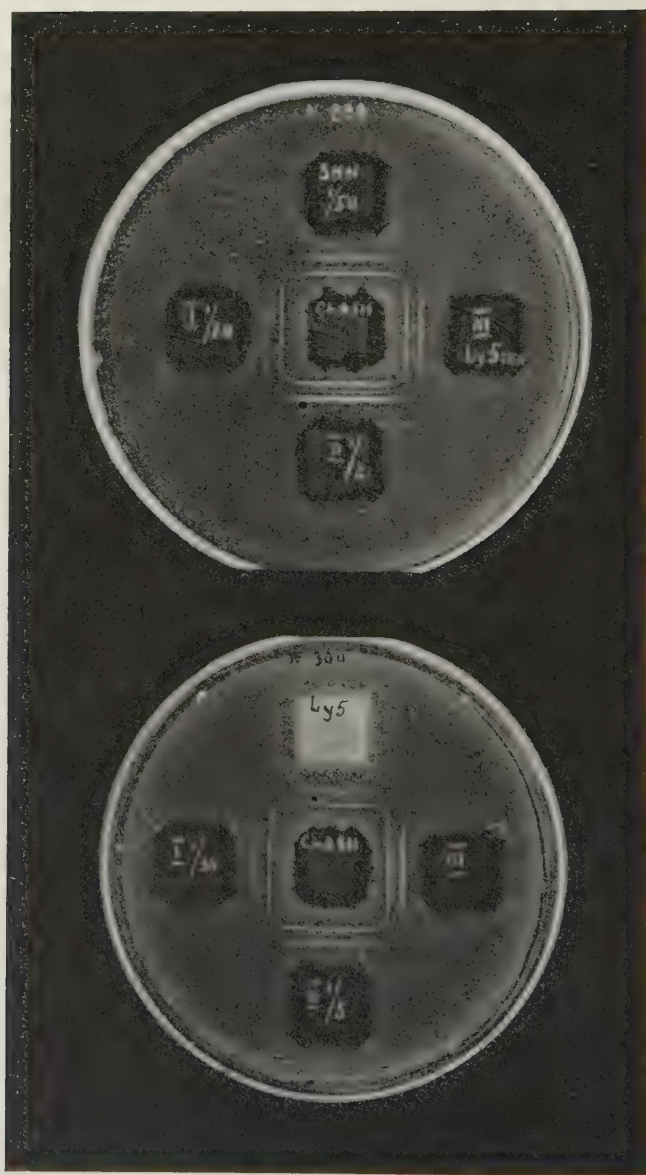


FIG. 3.

non identiques. Toute étude comparative doit, nous semble-t-il, tenir compte de ce fait.

b) La séparation des leucocytes normaux comporte deux handicaps : le prélèvement sur citrate et une centrifugation initiale assez rapide.

c) Pour la séparation des leucocytes leucémiques, les altérations « mécaniques » sont réduites au minimum grâce à la sédimentation préalable ; mais cette sédimentation a lieu à température du laboratoire et, au cours de ce délai, le catabolisme des leucocytes (quoique ralenti par l'apport de glucose) peut se poursuivre et aboutir à quelque dégradation.

d) Une contamination non négligeable par les plaquettes ne peut pas être évitée.

e) Le rendement de ces méthodes est faible.

f) Enfin, les suspensions leucocytaires ainsi obtenues ne comprennent pas une variété exclusive de leucocytes : nos suspensions de leucocytes normaux sont enrichies en polynucléaires (75 à 85 p. 100), mais comportent 15 à 25 p. 100 d'éléments mononucléés et une séparation plus sélective se révèle impossible si l'on veut recueillir des quantités suffisantes ; nos suspensions de leucoblastes comprennent 5 p. 100 d'éléments autres que des leucoblastes.

II. — PRÉPARATION DE LYSATS

A PARTIR DES SUSPENSIONS LEUCOCYTAIRES.

Nos recherches nécessitent l'obtention d'extraits contenant en solution les antigènes leucocytaires. Notre but était de trouver une méthode déterminant une lyse des cellules suffisamment brutale pour que l'action des enzymes protéolytiques intra-leucocytaires n'ait pas le temps de se produire, et n'entraînant cependant pas une dénaturation des protéines.

Nous avons rejeté *a priori* toutes les méthodes d'extraction chimiques (telles que extraction par l'alcool) car on sait qu'elles aboutissent bien souvent à une dénaturation des protéines. La méthode qui consiste à pratiquer des congélations et décongélations successives n'extrait qu'une faible partie des constituants endocellulaires. L'adjonction d'eau distillée au culot leucocytaire donne, même si l'on emploie des volumes importants d'eau, des résultats médiocres. L'action est étonnamment lente. Certes, l'on observe rapidement, au microscope à contraste de phase, des phénomènes de potocytose, mais une faible proportion des cellules est détruite.

Il est vrai que l'on n'est peut-être pas en droit d'admettre les mêmes critères de lyse pour les hématies et pour les leucocytes : la lyse d'un leucocyte n'est pas obligatoirement définie par la disparition même du corps cellulaire. Cependant l'extrac-

tion obtenue par action de l'eau distillée est de mauvaise qualité : on observe souvent des modifications du pH qui devient acide, témoignant de phénomènes d'autolyse ; nous avons pu prouver, par une étude immunochimique comparative, que le rendement, sur le plan antigénique, est médiocre, très inférieur à celui obtenu par action des ultrasons.

MÉTHODE UTILISÉE. — L'emploi des *ultrasons* nous semble représenter la meilleure méthode de lyse. Les caractéristiques de l'appareil utilisé sont les suivantes : générateur de la maison S. C. A. M. à quartz piézo-électrique ; fréquence, 800 Khz ; puissance acoustique totale : 100 watts environ.

La suspension leucocytaire (en solution « conservatrice ») est placée dans une cloche stérile en verre dont le fond est formé par une membrane en nitrocellulose transparente aux ultrasons et imperméable à l'eau.

La cavitation produite par le passage des ondes ultrasonores provoque, outre les actions mécaniques, des actions chimiques qui sont pour la plupart des oxydations [19]. C'est pourquoi nous effectuons toutes les irradiations *sous atmosphère d'hydrogène*, selon la technique préconisée par l'un de nous. Dans ces conditions, on n'a pas à craindre de dénaturation des protéines [20].

On détermine la *durée* nécessaire à la lyse en pratiquant toutes les minutes un contrôle microscopique entre lame et lamelle. Au bout de deux minutes, 50 p. 100 au moins des leucocytes sont détruits. Nous continuons l'irradiation jusqu'à ce que l'on ne voie plus une seule cellule à l'examen microscopique. Le délai nécessaire pour obtenir ce résultat est toujours inférieur à dix minutes. Nous avons remarqué que les lymphocytes résistent plus longtemps à l'action des ultrasons que les granulocytes. Ce fait a d'ailleurs été récemment signalé par Wyt et par Dietz [21]. Mais, contrairement aux observations de Morrow [22], nous n'avons pas constaté que les granulocytes normaux étaient plus sensibles à l'action des ultrasons que les granulocytes de leucémie myéloïde chronique.

Quoi qu'il en soit, les temps d'irradiation nécessaires pour lyser totalement les leucocytes sont bien inférieurs à ceux qui, même si l'on opère en présence d'air et non d'hydrogène, sont nécessaires pour obtenir une dénaturation des protéines : il faut, avec ce même appareil, procéder à une irradiation d'une durée supérieure à trois heures pour faire disparaître la bande d'absorption U. V. caractéristique d'une solution de sérum-albumine à 1 p. 100 ; même avec des temps d'irradiation très longs (de l'ordre de plusieurs heures), et sans hydrogène, les modifications immuno-chimiques observées sont très faibles.

Le pH de la suspension a été systématiquement contrôlé après

le passage des ondes ultrasonores : jamais nous n'avons observé de modifications du pH, qui se maintient à 7,3.

Nous avons procédé au dosage de l'azote total, par la micro-méthode de Kjeldahl, pour chacune des suspensions leucocytaires préparées, après irradiation par les ultrasons. La suspension étant ainsi devenue plus homogène, la mesure est plus précise que si l'on procède au prélèvement avant la lyse. Notre but était de savoir si la teneur en azote est différente (pour une même concentration initiale en leucocytes de la suspension) selon qu'il s'agit de leucocytes normaux ou d'une des variétés de leucocytes leucémiques. Nous n'avons pas constaté de différence valable : quel que soit le type de leucocytes, la teneur en azote total est approximativement la même, de l'ordre de 1 mg d'azote par millilitre d'une suspension contenant 100 000 leucocytes par millimètre cube, à condition bien entendu que la suspension ne soit « souillée » ni par de l'hémoglobine, ni par du sérum.

La suspension de leucocytes détruits, ainsi obtenue par action des ultrasons, est centrifugée dans des tubes stériles à la vitesse de 18 000 tours/minute pendant une demi-heure. Si le surnageant est encore très opalescent, on procède à une seconde centrifugation identique. Les lysats obtenus sont limpides ou légèrement opalescents. Leur stérilité est vérifiée par ensemencement sur gélose et bouillon. Leur teneur en protéides est assez faible. En appréciant leur teneur en azote précipitable par l'acide trichloracétique, on constate qu'elle est de l'ordre de 2 à 6 mg par millilitre, selon la richesse en leucocytes de la suspension initiale. Dès que l'on essaye de concentrer les lysats au delà de ces limites, survient une précipitation. C'est pourquoi nous n'avons pu pratiquer sur les lysats ni étude spectrographique ni étude électrophorétique valable. C'est pourquoi aussi aucune des techniques immunologiques nécessitant l'emploi d'une solution riche en protéides n'a pu être appliquée.

CONSERVATION DES LYSATS. — Si l'on conserve ces lysats à la glacière à 4° C, on voit plus ou moins rapidement se former un précipité contenant environ 10 p. 100 d'azote, donc partiellement constitué par des protéines. Cette précipitation est probablement la conséquence d'actions enzymatiques. C'est pourquoi il est indispensable de congeler ces lysats dès leur obtention et de les conserver à — 20° C. Cette congélation a un double avantage : éviter toute action enzymatique et éviter toute pollution.

III. — PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTI-LEUCOCYTAIRES.

C'est le lapin que nous avons choisi comme animal producteur d'immunsérums. Nous avons immunisé au total 50 lapins avec des

leucocytes provenant du sang de sujets normaux ou leucémiques :
20 lapins ont été immunisés avec des leucocytes normaux ;
10 lapins avec des leucocytes de leucémie myéloïde chronique ;
10 lapins avec des leucocytes de leucémie lymphoïde chronique ;
10 lapins avec des leucoblastes de leucémie aiguë.

La plupart des lapins ont été immunisés avec la suspension leucocytaire elle-même. Quelques lapins ont été immunisés parallèlement avec le lysat leucocytaire obtenu par action des ultrasons sur la même suspension. Nous n'avons pas observé de différences valables entre les deux lots dans la formation d'anticorps précipitants anti-leucocytaires.

De plus, une série de lapins a été immunisée avec une suspension leucocytaire obtenue à partir d'une rate, pesant 4 kg, recueillie lors d'une splénectomie chez un malade atteint de leucémie myéloïde chronique.

Chaque lapin a été saigné avant toute injection de leucocytes, de manière à pouvoir utiliser, comme sérum-témoin, non pas le sérum d'un quelconque lapin normal mais celui des animaux ultérieurement immunisés.

Techniques utilisées pour l'immunisation. — Pour nos premières séries, nous avons employé la voie intraveineuse. Les injections sont pratiquées les quatre premiers jours de chaque semaine pendant quatre à cinq semaines consécutives. La suspension injectée est riche en leucocytes : 200 à 400 000 leucocytes par millimètre cube. Le volume injecté est de 0,5 ml par injection la première semaine, 1 ml la deuxième semaine, 2 ml les semaines suivantes. Les lapins sont saignés huit à dix jours après la dernière injection.

Pour les séries suivantes, nous avons utilisé la méthode de Freund (injection sous-cutanée avec adjuvants). La suspension leucocytaire est mélangée à un émulsifiant (aquaphor), puis à de l'huile de paraffine et à des bacilles de Koch tués par la chaleur. Les proportions que nous avons utilisées, en nous référant à la technique originale décrite par Freund, sont les suivantes : 30 ml de suspension leucocytaire (soit environ 500 mg de protéides) pour 10 g d'aquaphor, 20 ml d'huile de paraffine et 50 mg de bacilles de Koch desséchés. Nous pratiquons une injection sous-cutanée de ce mélange chaque semaine pendant quatre semaines consécutives, à raison de 2 ml pour la première injection, 3 ml pour la deuxième, 4 ml pour la troisième, 5 ml pour la quatrième injection et éventuellement la cinquième. Les lapins sont saignés un mois après la dernière injection.

Les immunsérums recueillis stérilement sont conservés à la glacière après adjonction, comme antiseptique, de merthiolate à concentration finale de 1/10 000.

Nous avons étudié le pouvoir hémolysant de chacun de nos

sérums anti-leucocytaires. Pour plus de la moitié de ces sérums, on n'obtenait aucune action hémolysante, après adjonction de complément. Ceux des sérums qui déterminaient une hémolyse des globules rouges humains n'étaient actifs qu'à l'état brut ou après faible dilution ; le titre de la réaction hémolytique était inférieur à 1/16 et ne dépassait en règle pas 1/4.

Les immunosérums obtenus par la technique de Freund sont en règle plus riches en anticorps précipitants anti-leucocytaires que les antisérums obtenus après immunisation par voie intraveineuse. L'étude comparative des sérums des deux séries de lapins immunisés simultanément avec la même suspension leucocytaire par

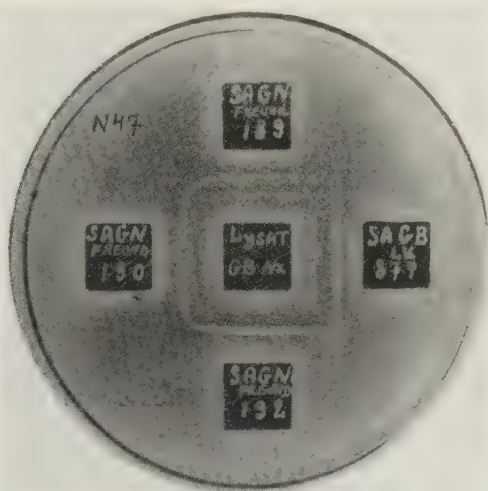


FIG. 4.

chacune des deux techniques nous a permis d'observer ce fait à plusieurs reprises.

Nous avons aussi constaté que, selon que l'on emploie l'une ou l'autre de ces deux voies d'introduction, les lapins répondent par la formation d'anticorps précipitants anti-leucocytaires non identiques. La photographie de la figure 4 démontre ce fait : les lignes de précipitation formées par les anticorps anti-leucocytaires des différents immunosérums obtenus par la méthode de Freund sont en continuité parfaite ; mais elles croisent les lignes correspondant aux anticorps de l'un des anti-sérums recueillis après immunisation par voie intraveineuse.

Il est difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de trouver une explication valable à cette différence de comportement des lapins. On peut cependant penser que la voie par laquelle

cheminent les constituants leucocytaires est différente selon le lieu d'introduction de ces antigènes : voie veineuse dans un cas, lymphatique dans l'autre. L'organe où sont formés les anticorps pourrait donc être différent. Des recherches ultérieures nous permettront peut-être de préciser ce point.

Toujours est-il que, en pratique, toute étude comparative doit porter sur des immun sérums obtenus par la même technique d'immunisation.

Mais toute recherche ayant pour but de dénombrer et de comparer des antigènes se heurte à un écueil majeur : des lapins immunisés avec la même solution antigénique et par la même méthode ne répondent pas tous de la même manière. Non seulement la concentration en tel ou tel anticorps est variable dans les différents sérums, mais certains des lapins ne forment pas d'anticorps précipitants envers certains des antigènes. Ces variations dans la réponse individuelle des lapins impliquent la nécessité d'immuniser de nombreuses séries de lapins et d'enregistrer attentivement le comportement de chacun des sérums anti-leucocytaires pour en réaliser une sélection. De nombreuses expériences de contrôle sont indispensables avant de pouvoir énoncer quelques conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. H. MINOR et L. BURNETT. *Blood*, 1949, **4**, 667.
- [2] R. ROBINEAUX. *Thèse Médecine*, Paris, 1951, **114**.
- [3] P. SZILARD. *Arch. ges. Physiol.*, 1926, **241**, 597.
- [4] T. P. SINGER, I. SILBERBACH et S. SCHWARTS. *Blood*, II, Special Issue, 1947, n° 1, **88**.
- [5] F. SPEARS. *Blood*, 1948, **3**, 1055.
- [6] B. L. VALLEE, W. L. HUGHES et J. G. GIBSON. *Blood*, Special Issue, 1947, n° 1, **88**.
- [7] G. VANZETTI et C. CANDIANI. *Haematologica*, 1947, **30**, 461.
- [8] A. H. MINOR et L. BURNETT. *Blood*, 1943, **3**, 799.
- [9] S. J. GREY et E. B. MITCHELL. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1942, **51**, 403.
- [10] M. GUILLOT et A. FIEHRER. *Sang*, 1948, **49**, 59.
- [11] R. ROBINEAUX, J. LEBRUN, R. KOURILSKY et A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1949, **77**, 710.
- [12] J. L. TULLIS. *Blood*, 1952, **7**, 891.
- [13] B. MAUPIN et R. CHARY. *Sang*, 1952, **23**, 336.
- [14] M. PESSIS. *Sang*, 1940, **14**, 262.
- [15] B. MAUPIN. *Sang* (à paraître). *Communic. à la Soc. Fr. Hématol.* (séance du 17 juin 1954).
- [16] J. L. TULLIS. *Blood*, 1951, **6**, 772.
- [17] O. OUCHTERLONY. *Ark. Kemi. Miner. Geol.*, 1948, **B.26**, 14.
- [18] M. SELIGMANN, P. GRABAR et J. BERNARD. *Sang*, 1955, **26**, 52.
- [19] R.-O. PRUDHOMME et P. GRABAR. *J. Chim. Phys.*, 1949, **46**, 323.
- [20] R.-O. PRUDHOMME et P. GRABAR. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 122.
- [21] W. DIETZ. *Ultraschall*, in *Med. u. Grenzgebieten*, 1954, **7**, 119.
- [22] P. B. MORROW. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1949, **40**, 843.

ACTION DES ANTIBIOTIQUES ET DES SULFAMIDES *IN VITRO* SUR LES BACTÉRIES AÉROBIES SPOROGÈNES

par C. TOUMANOFF et B. VIRAT (*).

[Collaboration technique : M^{lle} M. LAPIED et M^{me} MALMANCHE.]

(Institut Pasteur, Services de Pathologie des Insectes
et de Microbiologie Animale.)

Dans une publication antérieure ont été rapportés les résultats de l'action *in vitro* de certains antibiotiques sur les souches entomophytes ou non de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. [12].

Dans la même publication on a comparé le comportement vis-à-vis de quelques antibiotiques des diverses souches de *cereus* pathogènes ou non pour les insectes avec celui de *B. anthracis*.

Il résulte de cette comparaison que les souches virulentes de *B. anthracis* provenant de la collection du Service de Microbiologie Animale de l'Institut Pasteur se montrent toutes sensibles à l'action de la pénicilline, contrairement aux souches de *B. cereus* entomophytes ou saprophytes.

Ces résultats concernant la sensibilité à la pénicilline de *B. anthracis in vitro* ont confirmé ceux de Garrod et de divers autres auteurs [2].

L'action des antibiotiques sur les autres bactéries aérobies sporogènes *in vitro* n'étant que peu connue, nous avons cru intéressant d'étendre nos observations à divers autres germes de ce groupe en utilisant les mêmes antibiotiques ainsi que d'autres dont l'action n'avait pas été étudiée antérieurement.

Nous avons pensé qu'il pouvait être également de quelque intérêt d'étudier l'effet *in vitro* sur ces diverses bactéries et aussi sur *B. anthracis* de divers sulfamides.

Si ces épreuves ne présentent apparemment pas un intérêt pratique direct du point de vue de la pathologie humaine et animale en ce qui concerne les souches non pathogènes pour l'homme ou les animaux supérieurs, leurs résultats seront importants sur le plan biologique et aussi du point de vue de la pathologie des

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 janvier 1955.

insectes. Un grand nombre de germes aérobies sporogènes provoquant les maladies des insectes appartiennent en effet à des groupes qui englobent la plupart des saprophytes.

Ils peuvent, d'autre part, apporter des éléments nouveaux et utiles quant à la connaissance du comportement des différentes espèces vis-à-vis des antibiotiques et sulfamides *in vitro* dans un but de diagnose de différentes souches d'une même espèce.

Les résultats obtenus pourront ainsi s'ajouter aux caractères distinctifs de ces bactéries, caractères souvent fournis d'une manière empirique par l'usage de certains milieux de culture. Ils pourront enfin donner certaines indications aux spécialistes en vue d'études biochimiques plus complexes afin d'établir les causes régissant dans chaque cas particulier le comportement parfois très différent, comme on le verra plus loin, des diverses bactéries aérobies sporogènes à l'égard des antibiotiques ou des sulfamides. En effet, il n'est pas certain que ces bactéries produisent les mêmes facteurs antagonistes, notamment de l'action inhibitrice des sulfamides, que les bactéries aérobies asporogènes pathogènes pour l'homme ou les animaux et qui ont surtout servi pour l'étude des sulfamido-résistances.

Nous relaterons tout d'abord les résultats de nos observations sur l'action des antibiotiques pour rapporter ensuite ceux concernant les sulfamides.

A. — ACTION DES ANTIBIOTIQUES.

Dans la dernière édition de leur monographie sur les bactéries aérobies sporogènes, N. R. Smith, R. E. Gordon et F. E. Clark [41] divisent, d'après l'aspect de leurs sporanges et d'autres caractères, toutes ces bactéries en trois groupes dont nous n'avons étudié que des représentants des deux premiers. Le premier de ces groupes comporte : *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. cereus* var. *anthracis*, *B. cereus* var. *thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* et ses variétés, *B. pumilus*, *B. firmus* et *B. lentus*.

Dans le deuxième groupe ils incorporent : *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. stercorophilus*, *B. circulans*, *B. alvei*, *B. laterosporus*, *B. pulvificiens*, *B. brevis*.

Nous présentons dans le tableau I les résultats du comportement vis-à-vis des antibiotiques courants (première série de l'Institut Pasteur) d'un certain nombre de souches dont sont exclues les souches de *B. cereus* qui ont été étudiées précédemment [12]. Ces résultats sont exprimés par des chiffres indiquant soit la concentration inhibitrice calculée en UO/cm³ pour la pénicilline, µg pour certains autres antibiotiques, U/cm³ pour la bacitracine, soit par le diamètre en millimètres de la zone

TABLEAU I. — Sensibilité aux antibiotiques (1^{re} série)
de diverses bactéries aérobies sporogènes.

Souches	Péni- cilline (UO/cm ³)	Terra- mycine (µg)	Chloro- mycétine (µg)	Auréo- mycine (µg)	Strepto- mycine (µg)
Groupe I =====					
<i>E. firmus</i> 5133	R	27	6	4,6	11,5
<i>E. firmus</i> 5270	O,056	2,4	4,1	1	21
<i>B. laterosporus</i> 5131	R	R	2	6	11
<i>B. laterosporus</i> 5223	R	R	2	R	0,28
<i>B. licheniformis</i> A41	R	7,1	4,9	0,64	2,9
<i>B. licheniformis</i> A2	R	3,9	7	2,4	21
<i>B. licheniformis</i> 5126	R	4,6	4,9	3	11,5
<i>B. licheniformis</i> 5272	R	R	R	22	8,5
<i>B. megaterium</i> 5219	R	7,1	4,9	2,4	2,9
<i>B. megaterium</i> 5220	O,2	3,9	1,4	1	11
<i>B. megaterium</i> 5117	R	5,8	6	R	7,1
<i>E. pumilus</i> 5118	R	4,6	R	1,9	7,1
<i>E. pumilus</i> 5267	O,16	19	R	7,1	3,7
<i>B. subtilis</i> A4	R	R	20	103	2,9
<i>B. subtilis</i> 5148	R	3,9	8	1,25	2,4
<i>B. subtilis</i> 5150	R	R	4,1	43	58
<i>B. subtilis</i> 5151	R	4,6	8	3	2,9
<i>B. subtilis</i> 5152	R	3	8	2,4	2,9
<i>B. subtilis</i> 5262	R	7,1	6	1,9	0,8
<i>B. subtilis</i> 5265	R	R	3,5	20	32
Groupe II =====					
<i>E. brevis</i> A32	O,2	10,15	8	19	32
<i>E. brevis</i> 5122	O,067	R	R	35	30,8
<i>E. polymyxa</i> 5278	R	R	14	27	8,5

d'inhibition pour la néomycine et la framycétine. La résistance totale est exprimée par la lettre R ou O [mm] (1).

Comme on le voit, la plupart des souches de bactéries aérobies sporogènes, à l'exception d'une souche de *firmus*, d'une de *megaterium*, d'une de *pumilus*, et d'une de *brevis*, se sont montrées résistantes à la pénicilline.

Toutes ces souches ne présentèrent pas un comportement bien caractéristique à l'égard des divers antibiotiques de cette première série. On peut même noter le comportement extrêmement varié de *B. subtilis*.

(1) Dans la note antérieure la présentation des résultats peut prêter à confusion ; en effet, la résistance totale ou quasi totale fut exprimée dans les tableaux par O, qui indiquait l'absence d'une inhibition apparente, le taux de sensibilité fut représenté par O avec des décimales et par des unités dont l'accroissement, on le conçoit, indiquait une résistance plus manifeste. Les O dans la note antérieure gagneront ainsi à être remplacés par la lettre R indiquant la résistance quasi totale ou totale.

Les résultats de l'action de six autres antibiotiques (deuxième série de l'Institut Pasteur) sur divers *cereus* entomophytes sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Sensibilité aux antibiotiques (2^e série)
des *cereus* entomophytes.

Souches	Tetra- cycline (µg)	Erythro- mycine (µg)	Baci- tracine (U/cm ²)	Neo- mycine diam/mm	Framy- cétine diam/mm
<i>Cereus</i> var. <i>alesti</i>	1,7	0,27	7,8	31mm	22mm
<i>Cereus</i> var. <i>thuringiensis</i> (Steinhaus)	5,8	0,21	5,8	24mm	26mm
<i>Cereus</i> var. <i>thuringiensis</i> (Metalnikov)	5,8	0,24	7,8	30mm	24mm
<i>Cereus</i> var. <i>sotto</i> (virulente)	1	0,36	5,8	27mm	22mm
<i>Cereus</i> var. <i>sotto</i>	1,3	0,24	3,4	28mm	26mm
<i>Cereus</i> var. P/3	7,4	0,27	3,4	26mm	24mm
<i>Cereus</i> var. <i>cazaubon</i> I	15,5	0,27	10	31mm	26mm
<i>Cereus</i> var. <i>cazaubon</i> 2	9,2	0,24	7,8	33mm	23mm
<i>Cereus</i> var. <i>galechiae</i>	9,2	0,31	4,6	27mm	24mm

On constate qu'aucune des souches étudiées ne présente de particularité marquante dans son comportement vis-à-vis des antibiotiques utilisés, toutes ces souches étant sensibles à l'érythromycine, la framycétine et la néomycine et plutôt résistantes à la bacitracine. Une résistance très marquée à la tétracycline est à noter pour trois souches : *cereus* var. *cazaubon* n^{os} 1 et 2 et *cereus* var. *galechiae*.

Les résultats de l'action de cette même série d'antibiotiques sur les *cereus* saprophytes sont indiqués dans le tableau III.

L'examen du tableau III révèle en outre la sensibilité très marquée de la plupart de ces souches à l'érythromycine, le comportement très varié allant d'une sensibilité très grande (*cereus* A 28) à une forte résistance (*cereus* A 25) en ce qui concerne la tétracycline, et la résistance généralement très marquée à la bacitracine allant parfois jusqu'à l'insensibilité quasi totale (souches A 25 et 5258). Le comportement de ces souches à l'égard de la framycétine et de la néomycine est comparable à celui des souches entomophytes.

L'action de la deuxième série d'antibiotiques sur diverses bactéries aérobies sporogènes est résumée dans le tableau IV.

Cette étude a été effectuée sur un nombre plus réduit de souches

TABLEAU III. — Sensibilité aux antibiotiques (2^e série)
des *cereus* saprophytes.

Souches	Tétra- cycline (μ g)	Erythro- mycine (μ g)	Baci- tracine (U/cm ³)	Neo- mycine (diam/mm)	Framy- cétine (diam/mm)
<i>Cereus</i> A.25	15,5	0,24	R	27mm	24mm
<i>Cereus</i> A 5	5,8	0,21	10	29mm	27mm
<i>Cereus</i> A 28	0,8	0,36	16	26mm	22mm
<i>Cereus</i> 5257	3,5	0,72	10	28mm	26mm
<i>Cereus</i> 5258	3,5	0,24	R	31mm	25mm
<i>Cereus</i> 5127	1	0,36	7,8	25mm	22mm
<i>Cereus</i> A 30	0,8	0,15	14	27mm	25mm
<i>Cereus</i> A 31	3,5	0,96	19	28mm	28mm
<i>Cereus</i> D 5132	3,5	0,24	7,8	29mm	26mm
<i>Cereus</i> A 29	7,4	1,1	12	25mm	21mm

TABLEAU IV. — Sensibilité aux antibiotiques (2^e série)
de diverses bactéries aérobies sporogènes.

Souches	Tétra- cycline (μ g)	Erythro- mycine (μ g)	Baci- tracine (U/cm ³)	Neo- mycine (diam/mm)	Framy- cétine (diam/mm)
Groupe I =====					
<i>B. licheniformis</i> A23	1	0,53	R	25mm	23mm
<i>B. licheniformis</i> A41	0,49	0,31	R	23mm	22mm
<i>B. licheniformis</i> 5126	0,43	0,48	R	24mm	23,5mm
<i>B. licheniformis</i> 5272	42	R	R	23mm	22mm
<i>B. megaterium</i> 5117	1,9	0,48	1,3	23mm	21mm
<i>B. megaterium</i> 5219	1,7	0,36	2,4	24,5mm	24mm
<i>B. megaterium</i> 5220	2,5	0,48	0,22	28mm	24mm
<i>B. pumilus</i> 5118	1,7	0,24	7,8	22mm	19mm
<i>B. pumilus</i> 5242	5,8	0,9	3,4	20mm	18mm
<i>B. pumilus</i> 5267	1,7	0,72	2,7	23mm	19mm
<i>B. subtilis</i> A 4	100,5	0,36	R	24mm	20mm
<i>B. subtilis</i> 5148	0,49	0,21	10	30mm	27,5mm
<i>B. subtilis</i> 5150	54	0,36	R	23mm	18mm
<i>B. subtilis</i> 5151	1,7	0,27	R	23mm	23mm
<i>B. subtilis</i> 5152	0,49	0,48	2,7	29,5mm	29mm
<i>B. subtilis</i> 5262	0,8	0,27	R	27,5mm	22mm
<i>B. subtilis</i> 5265	25	0,36	R	23mm	21,5mm
Groupe 2 =====					
<i>B. alvei</i>	15,5	0,82	R	20,5mm	16mm
<i>B. brevis</i> A32	54	R	9	22mm	17mm
<i>B. brevis</i> 5122	25	0,21	R	17mm	14mm
<i>B. brevis</i> 5287	R	R	R	18mm	14,5mm
<i>B. polymyxa</i> 5277	0,49	0,31	R	24mm	20mm
<i>B. laterosporus</i>	5,8	1,1	R	22mm	14,5mm
<i>B. laterosporus</i> 5131	2,2	0,69	R	17mm	12,5mm
<i>B. laterosporus</i> 5223	42	0,071	R	23mm	17mm

qu'avec les antibiotiques de la première série. Elle n'a pas permis de faire ressortir une similitude de comportement vis-à-vis de ces antibiotiques des diverses bactéries appartenant à différentes espèces.

Il n'y a que quatre souches d'origines variées de *B. licheniformis* et trois de *B. laterosporus* qui se soient montrées entièrement résistantes à l'égard de la bacitracine. Par contre, trois souches de la première de ces espèces étaient sensibles et la quatrième fortement résistante à la tétracycline. Pour toutes les autres espèces il paraît difficile de noter un comportement spécifique vis-à-vis de tel ou tel antibiotique de cette série ; c'est ainsi que parmi les *subtilis* nous notons trois souches extrêmement résistantes à la tétracycline, les quatre autres, par contre, étant sensibles à cet antibiotique.

On peut dire que, dans l'ensemble, les diverses souches de chaque espèce bactérienne présentent des caractères individuels marqués quant à leur comportement vis-à-vis des antibiotiques.

On ne peut exclure que résistance ou sensibilité puisse être soit acquise, soit perdue par la même espèce bactérienne. Cependant nous avons constaté qu'en ce qui concerne les *cereus* ce comportement vis-à-vis des antibiotiques atteste *in vitro* une stabilité certaine, les souches éprouvées n'ayant pas modifié leurs propriétés au cours de plusieurs essais.

Le comportement de *B. anthracis* à l'égard de la première série d'antibiotiques a été rapporté dans une publication antérieure. Répétée, l'épreuve a donné toujours des résultats pratiquement analogues.

Nous ne rapporterons ici que les résultats de l'étude de la sensibilité de diverses souches de ce germe vis-à-vis de la deuxième série d'antibiotiques. Ces résultats sont consignés dans le tableau V.

Ce tableau montre que toutes les souches virulentes de *B. anthracis* aussi bien que les vaccins et les souches rendues acapsulées sont sensibles à l'érythromycine.

On relève également que la plupart des souches et particulièrement deux d'entre elles (souches GC et VM) sont résistantes à la bacitracine qui agit différemment sur diverses autres souches de *B. anthracis*. Ce germe se comporte donc vis-à-vis de cet antibiotique à peu près de la même manière que certaines souches de *cereus* entomophytes. Les *cereus* saprophytes montrent en général une résistance plus marquée à ce produit. Les souches d'*anthracis* se distinguent dans leur ensemble des *cereus* entomophytes ou saprophytes par leur sensibilité vis-à-vis de la tétracycline ; en effet, parmi les souches de *cereus* saprophytes deux seulement se sont montrées très sensibles à cet antibiotique (voir tableau III).

TABLEAU V. — Sensibilité aux antibiotiques (2^e série) de *B. anthracis*.

Souches	Tetra- cycline (μ g)	Erythro- mycine (μ g)	Baci- tracine (U/cm ³)	Néo- mycine diam/mm	Framy- cétine diam/mm
GV (virulente)	0,03	0,5	3,5	34mm	30mm
MO (virulente)	0,04	0,9	3,5	36mm	30mm
GC (virulente)	0,03	0,6	20,0	32mm	36mm
WG (virulente)	0,08	0,7	1,0	33mm	33mm
GT (virulente)	0,10	0,7	2,5	33mm	29mm
V (virulente)	0,03	1,0	3,5	35mm	29mm
PT (virulente)	0,02	0,4	1,8	34mm	32mm
VM (virulente)	0,03	0,7	10,0	35mm	31mm
J. (virulente)	0,01	0,3	2,5	35mm	32mm
1 ^{er} Vaccin Pasteur	0,03	0,3	6,0	33mm	31mm
2 ^{ème} Vaccin Pasteur	0,01	0,25	0,8	40mm	36mm
Asporogène G	0,15	0,6	3,5	35mm	29mm
Acapsulée SE	0,05	0,5	2,5	32mm	30mm
Acapsulée SN	0,01	0,7	1,4	36mm	40mm

B. — ACTION DES SULFAMIDES.

L'étude de l'action *in vitro* des sulfamides sur divers germes aérobies n'a été faite, à notre connaissance, que pour *B. anthracis*. Elle n'a pas été faite pour les souches de *cereus*, ni pour diverses autres bactéries aérobies sporogènes, qu'elles aient été isolées d'insectes malades ou non.

Le tableau VI montre l'action de divers sulfamides sur les *cereus* entomophytes.

Comme on le voit par ce tableau, les huit variétés de *B. cereus* entomophytes se comportent *in vitro* sensiblement de la même manière à l'égard des quatre sulfamides utilisés. *B. cereus* var. *alesti* est le plus sensible au septoplax. Dans l'ensemble, toutes les souches de *cereus* entomophytes ont été trouvées sensibles aux sulfamides.

Les résultats obtenus avec les *B. cereus* saprophytes et avec divers autres bactéries sporogènes aérobies sont donnés dans le tableau VII.

L'examen de ce tableau révèle un fait très intéressant : sur 10 souches de *cereus* saprophytes, 7 se sont montrées résistantes

à tous les sulfamides, et une souche sensible au septoplir, légèrement au rufol et à l'adiazine, était résistante à la thiazomide.

La seule souche cataloguée dans la collection de l'Institut Pasteur comme *cereus* var. *mycoides* était résistante à tous les sulfamides.

D'autres bactéries du groupe I de Smith, Gordon et Clark se comportèrent toutes différemment vis-à-vis des divers sulfamides.

TABLEAU VI. — Sensibilité aux sulfamides des *cereus* entomophytes.

Souches	Septoplir	Thiazomide	Rufol	Adiazine
<i>B. cereus</i> var. <i>alesti</i>	39mm	31mm	30mm	30mm
<i>B. cereus</i> var. <i>cazaubon</i> I	24mm	20mm	17mm	16mm
<i>B. cereus</i> var. <i>cazaubon</i> 2	29mm	30mm	24mm	20mm
<i>B. cereus</i> var. <i>galechiae</i>	23mm	24mm	22mm	18mm
<i>B. cereus</i> var. <i>P/3</i>	30mm	27mm	25mm	21mm
<i>B. cereus</i> var. <i>sotto</i>	33mm	31mm	29mm	27mm
<i>B. cereus</i> var. <i>sotto</i> (virulent)	35mm	28mm	26mm	26mm
<i>B. cereus</i> var. <i>thuringien-</i> <i>sis</i> (français)	25mm	19mm	15mm	13mm
<i>B. cereus</i> var. <i>thuringien-</i> <i>sis</i> (allemand)	27mm	25mm	25mm	19mm

Il en résulte qu'au sein d'une même espèce il peut exister :

1° Des souches qui sont complètement résistantes à tous les sulfamides utilisés et d'autres qui, au contraire, y sont sensibles (*B. licheniformis*) ;

2° Des souches qui sont sensibles à un ou à tous les sulfamides employés (*B. firmus*) et d'autres qui sont résistantes à l'un des sulfamides et modérément sensibles aux trois autres (*B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*).

Parmi les représentants du deuxième groupe bactérien des auteurs cités, les quatre souches de *B. brevis* se sont toutes montrées complètement résistantes aux quatre sulfamides utilisés : les deux souches de *polymyxa* montrèrent l'une une sensibilité très forte au septoplir et moyenne aux autres sulfamides, l'autre une sensibilité moyenne à deux sulfamides et une résistance totale aux deux autres.

Enfin, sur quatre souches de *B. laterosporus*, l'une était entièrement résistante, deux plus ou moins sensibles à tous les sulfamides et la dernière entièrement résistante à l'adiazine, faiblement sen-

TABLEAU VII. — Sensibilité aux sulfamides des *cereus* saprophytes et de diverses bactéries aérobies sporogènes.

Souches	Septoplix	Thiazomide	Rufol	Adiazine
<u>Groupe 1</u>				
<i>B. cereus</i> A5	31mm	0	16mm	16mm
<i>B. cereus</i> A25	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> A28	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> A29	30mm	25mm	24mm	28mm
<i>B. cereus</i> A30	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> A31	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> 5127	30mm	26mm	26mm	24mm
<i>B. cereus</i> D 5132	26mm	26mm	21mm	25mm
<i>B. cereus</i> 5257	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> 5258	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoïdes</i> 5259	0	0	0	0
<i>B. firmus</i> 5269	34mm	25mm	22mm	26mm
<i>B. firmus</i> 5133	26mm	0	0	0
<i>B. licheniformis</i> A23	0	22mm	22mm	22mm
<i>B. licheniformis</i> A41	30mm	25mm	25mm	23mm
<i>B. licheniformis</i> 5126	0	0	0	0
<i>B. licheniformis</i> 5272	0	0	0	0
<i>B. megaterium</i> 5117	0	24mm	20mm	21mm
<i>B. megaterium</i> 5219	32mm	18mm	15mm	20mm
<i>B. megaterium</i> 5220	0	26mm	19mm	20mm
<i>B. pumilus</i> 5118	21mm	25mm	22mm	24mm
<i>B. pumilus</i> 5242	34mm	23mm	22mm	22mm
<i>B. subtilis</i> A4	16mm	14mm	0	17mm
<i>B. subtilis</i> 5148	22mm	22mm	21mm	17mm
<i>B. subtilis</i> 5150	20mm	20mm	20mm	20mm
<i>B. subtilis</i> 5151	24mm	18mm	16mm	0
<i>B. subtilis</i> 5262	21mm	18mm	12mm	13mm
<i>B. subtilis</i> 5265	33mm	25mm	22mm	20mm
<u>Groupe 2</u>				
<i>B. alvei</i>	38mm	31mm	26mm	32mm
<i>B. brevis</i> A32	0	0	0	0
<i>B. brevis</i> 5122	0	0	0	0
<i>B. brevis</i> 5286	0	0	0	0
<i>B. brevis</i> 5287	0	0	0	0
<i>B. polymyxa</i> 5277	36mm	24mm	22mm	21mm
<i>B. polymyxa</i> 5278	25mm	0	0	28mm
<i>B. laterosporus</i>	25mm	22mm	19mm	0
<i>B. laterosporus</i> 5131	34mm	28mm	28mm	30mm
<i>B. laterosporus</i> 5223	22mm	25mm	25mm	20mm
<i>B. laterosporus</i> 5283	0	0	0	0

sible au rufol et moyennement sensible aux deux autres sulfamides.

Les résultats de l'étude de l'action des sulfamides sur la bactérie charbonneuse sont indiqués dans le tableau VIII.

Comme on peut le voir par ce tableau, parmi neuf souches virulentes de *B. anthracis*, l'une fut très sensible à tous les sulfamides, six montrèrent une sensibilité moyenne et les deux dernières une sensibilité faible au septoplix, à la thiazomide et au rufol et une résistance totale à l'adiazine.

On ne saurait affirmer actuellement d'une manière absolue qu'il existe une spécificité d'action des sulfamides sur divers germes ; néanmoins, Marshall et coll. ont mis en évidence une

certaine spécificité d'action des sulfamides sur certains germes pathogènes *in vitro* ; c'est ainsi qu'ils établirent que la sulfapyridine, le sulfathiazol et la sulfadiazine s'avèrent plus actifs sur *E. coli* que le sulfanamide [5].

TABLEAU VIII. — Sensibilité aux sulfamides de *B. anthracis*.

Souches	Septoplax	Thiazomide	Rufol	Adiazine
	diam/mm	diam/mm	diam/mm	diam/mm
GV (virulente)	26mm	28mm	24mm	20mm
MO (virulente)	27mm	18mm	23mm	0
GC (virulente)	35mm	26mm	23mm	23mm
WG (virulente)	33mm	26mm	32mm	28mm
GT (virulente)	28mm	23mm	22mm	20mm
V (virulente)	32mm	25mm	27mm	23mm
PT (virulente)	30mm	30mm	31mm	23mm
VM (virulente)	40mm	40mm	40mm	32mm
J (virulente)	26mm	20mm	23mm	0
1er Vaccin Pasteur	31mm	30mm	30mm	22mm
2ème Vaccin Pasteur	35mm	30mm	30mm	25mm
Asporogène G	20mm	17mm	0	15mm
Acapsulée SE	22mm	0	0	0
Acapsulée SN	22mm	0	0	0

Zone d'inhibition supérieure à 35 mm : souche très sensible ; zone d'inhibition entre 20 et 30 mm : sensibilité moyenne ; zone d'inhibition inférieure à 20 mm : sensibilité faible ; absence de zone d'inhibition : résistance.

On sait, d'autre part, que le sérum de cheval exerce un effet antagoniste pour l'action inhibitrice du sulfanamide sur le pneumocoque et les staphylocoques et non sur le streptocoque, ce qui expliquerait pourquoi *in vivo* le sulfanamide peut être spécifique des affections streptococciques (R. J. Henry, 1944 [3]).

Dans leur ensemble les résultats de l'effet des sulfamides *in vivo* dans les cas de charbon expérimental ou naturel sont assez variables. Les résultats encourageants de la thérapeutique anti-charbonneuse (Mitchell et coll., 1939 [8], Le Gac, 1945 [4], Rudelle, 1946 [9], Wilcox, 1947 [13]), et parfois les succès enregistrés (Sebetic, 1945 [10]), donnent à penser que c'est non seulement le choix des sulfamides mais la qualité des souches qui entrent en ligne de compte.

Quoique les recherches des divers auteurs montrent qu'il existe parfois une certaine discordance entre le résultat obtenu avec les sulfamides *in vivo* et ceux qui ressortent de l'étude de leur action *in vitro*, il est intéressant de rapporter ici les constatations, du reste très peu nombreuses, faites à ce sujet en ce qui concerne la bactériémie charbonneuse.

Mazare, 1953 [6], a signalé la sensibilité extrême *in vitro* d'une souche très virulente de *B. anthracis* à plusieurs sulfamides et notamment au septoplax, à l'adiazine et au rufol. La souche étudiée par cet auteur se rapprocherait donc de la souche VM de notre tableau.

La résistance à l'adiazine (sulfadiazine) de deux souches (J et MO) serait à rapprocher du cas d'insuccès du traitement du charbon signalé par Miller, Scott, Noe, Madin et Henley (1946) [7]. Ces auteurs ont constaté en effet que la sulfadiazine, même à des doses optima pour le traitement d'autres affections, n'avait qu'un effet très faible contre le charbon expérimental provoqué par la souche qu'ils utilisèrent.

Sans vouloir attribuer à ces rapprochements une valeur absolue, nous pensons que ce problème de la spécificité de l'action des sulfamides dans le charbon, spécificité variable suivant les souches rencontrées, mériterait d'être étudié d'une manière plus approfondie bien que, sur le plan thérapeutique, la question présente un intérêt moindre depuis l'avènement des antibiotiques.

Il apparaît néanmoins qu'il est possible de différencier certaines souches de bactériémie charbonneuse les unes des autres du fait de leur comportement vis-à-vis des sulfamides *in vitro*, et que les souches rendues asporogènes ou acapsulées et ayant perdu leur virulence changent leur comportement vis-à-vis de ces produits. C'est ainsi que la souche asporogène obtenue à partir de la souche virulente GV, moyennement sensible à tous les sulfamides, est devenue faiblement sensible à la thiazomide et à l'adiazine et résistante au rufol.

Nos deux souches acapsulées sont sensibles au septoplax (sulfanilamide), mais sont résistantes à la thiazomide (sulfathiazol) et au rufol (sulfa-méthyl-thio-diazol).

Il est difficile de donner une explication certaine de ce phénomène de la sensibilité plus grande de *B. anthracis* capsulé à certains sulfamides comparée à la résistance des formes acapsulées. On ne peut exclure que la présence de capsules entrave la production de la substance antagoniste à l'égard des inhibiteurs de certains sulfamides. On peut également supposer que les substances chimiques contenues dans la capsule subissent une modification au contact de certains sulfamides, modifications qui rendraient le germe plus sensible à l'égard du médicament. L'étude d'un plus grand nombre de souches acapsulées serait

nécessaire afin de s'assurer de la constance de ce phénomène de résistance qui, s'il se confirmait, gagnerait à être précisé du point de vue chimique.

CONCLUSIONS.

Il ressort de l'ensemble des faits exposés que :

1° La majorité des bactéries aérobies sporogènes, comme cela a déjà été signalé pour *B. cereus*, est résistante à l'égard de la pénicilline, contrairement à *B. anthracis* qui est sensible à cet antibiotique et qui, de ce point de vue, se comporte donc comme une espèce bactérienne spéciale.

2° Parmi les antibiotiques de la deuxième série, essayés vis-à-vis de *B. anthracis*, c'est à la tétracycline que ce bacille manifeste la sensibilité la plus marquée, toutes les souches de *cereus* entomophytes ou non étant plus ou moins et parfois même fortement résistantes à cet antibiotique.

3° Tous les *cereus* entomophytes étudiés présentèrent une sensibilité marquée à l'égard des sulfamides *in vitro*. Certains d'entre eux particulièrement pathogènes pour les insectes, et notamment *B. cereus* var. *alesti*, *B. cereus* var. *sotto*, *B. cereus* var. *thuringiensis* (souche allemande) et *B. cereus* var. P/3, étaient particulièrement sensibles à tous les sulfamides utilisés, les deux premiers, par ailleurs très proches, manifestant une sensibilité identique.

4° Parmi les *cereus* saprophytes, certains manifestent une résistance totale, d'autres une sensibilité moyenne à tous les sulfamides.

5° Diverses autres bactéries aérobies sporogènes peuvent se comporter d'une manière variable vis-à-vis des différents sulfamides ; toutefois les quatre souches de *B. brevis* de la collection de l'Institut Pasteur se sont montrées toutes résistantes aux sulfamides utilisés.

Il semble donc bien que l'action des antibiotiques et des sulfamides *in vitro* pourrait être utile à la différenciation des souches de bactéries aérobies sporogènes appartenant à une même espèce. Il y aurait intérêt à employer ce procédé conjointement avec d'autres méthodes de diagnostic, notamment en ce qui concerne la distinction des variétés au sein des espèces pathogènes pour les insectes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. CHABBERT. *Ann. biol. Clin.*, 1951, **9**, 81 et 544.
- [2] L. P. GARROD. *Antibiotics and Chemoth.*, 1952, **2**, 689.
- [3] R. J. HENRY. *The mode of action sulphonamides*. Publ. of Josiah Macy Found., 1944, **2**, n° 1, review series, 285.

- [4] P. LE GAC, A. FOUBERT et L. AIHONNOU. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1945, **38**, 252.
- [5] E. K. MARSHALL JR. *J. Pharmacol.*, 1942, **76**, 226 (voir également J. T. LITCHFIELD, H. J. WHITE, A. C. BRATTON et R. G. SHEPHERD, cités par Henry).
- [6] Y. MAZARE. *Lyon Médical*, 1953, **189**, 287.
- [7] E. S. MILLER, E. B. SCOTT, H. A. NOE, S. H. MADIN et T. F. HENLEY. *J. Immunol.*, 1946, **53**, 371.
- [8] C. A. MITCHELL, R. V. L. WALKER et D. G. MAC KERCHER. *Canad. J. comp. Path.*, 1939, **3**, 119.
- [9] RUDELLE. *Algérie méd.*, 1945, **37**,
- [10] C. SEBETIC. *Veter. Med. Dissert. Zagreb.*, in *Veter. Arhiv.*, 1941, **41**, n° 8.
- [11] N. R. SMITH, R. E. GORDON et F. E. CLARK. *Aerobic sporeforming bacteria*. Agricultural Monograph., novembre 1952, n° 6.
- [12] C. TOUMANOFF et M^{lle} LAPIED. *Ces Annales*, 1954, **87**, 37.
- [13] R. B. WILCOX. *Veter. Med.*, 1944, **39**, 461.

BACTÉRIOPHAGES TYPHIQUES

A GRANDES ET A PETITES PLAGES

DES EAUX POLLUÉES ET LEUR PHOTOSENSIBILITÉ

par A. GUELIN (*).

(Institut Pasteur de Paris et Station Zoologique de Villefranche.)

La présence dans les eaux de certains bactériophages spécifiques peut indiquer la pollution de ces eaux par un germe pathogène. Les bactériophages Vi (Craigie et Brandon, 1936 [4]; Scholtens, 1936 [30]; Sertic et Boulgakoff, 1936 [32]), spécifiquement actifs sur les souches typhiques Vi (Felix et Pitt, 1934 [41]) sont les révélateurs par excellence de *Salmonella typhi* dans les eaux.

Vdovenko et Margo en 1941 [33], Guerman en 1948 [21], Michoustine et Pertzowska en 1954 [23] ont supposé la présence dans certaines eaux de bactériophages entraînés du sol par les pluies. Néanmoins la possibilité de la contamination de ces eaux subsiste, car des bactéries pourraient être également entraînées par les eaux de pluie.

L'emploi du bactériophage pour la détection du bacille typhique a été préconisé par Guelin et Le Bris (1947 [20]). Guelin, en 1948 [15], décrit la méthode d'isolement des bactériophages Vi dans les eaux. Gernez-Rieux, Buttiaux et Muchemblé (1949 [12]) soulignent l'importance de la recherche de ces phages pour la détection du bacille d'Eberth. Morzycki, Morzycka et Georgiades (1952 [24]) après une étude des eaux de la Vistule sur une longueur de 427 km, concluent que le bactériophage typhique Vi peut être considéré comme le détecteur spécifique et sensible du bacille typhique dans l'eau; la résistance de ce phage dans les eaux industrielles (nuisibles à *E. coli*) augmente sa valeur. Son origine humaine, démontrée par Morzycka et Georgiades en 1951 [25], fait ressortir tous les avantages de l'emploi de la méthode bactériophagique dans l'hygiène des eaux.

Cependant, la seule présence des phages dans une eau ne prouve pas l'ancienneté de la contamination de celle-ci, car la disparition du bacille typhique est plus rapide que celle du

(*) Manuscrit reçu le 25 novembre 1954.

phage Vi (Guclin, 1950 [16]; Buttiaux, 1951 [2]; Emilianowicz, 1952 [9]).

Bien que le séjour prolongé du bactériophage Vi dans l'eau ne lui enlève pas sa spécificité vis-à-vis des souches typhiques, sa concentration diminue avec le temps, surtout pendant les premiers jours (Guclin, 1948 [15], 1950 [16, 17]); des facteurs tels que la température, l'irradiation solaire, le pH de l'eau, ou la minéralisation interviennent directement. C'est donc la quantité de phages isolés qui permettra d'établir, approximativement, l'ancienneté de la contamination de l'eau. Les bactériophages spécifiques trouvés en grande quantité prouvent une pollution récente de l'eau; par contre, leur isolement répété en petit nombre fait supposer une contamination plus ancienne.

D'après nos études dans les eaux de la Méditerranée, de la Seine et de la Tamise, le taux d'un bactériophage varie suivant son espèce. Dans les conditions données, le bactériophage typhique mis en évidence dans 0,1 à 0,01 cm³ d'eau, peut être considéré comme s'y trouvant en grande quantité. La même évaluation est appliquée pour le phage *coli* isolé dans 0,001 à 0,0001 cm³, ainsi que pour le phage *perfringens* trouvé dans 1 cm³. La différence constatée dans la quantité des phages isolés dans la même eau coïncide probablement avec le nombre de germes par lesquels l'eau est polluée. La quantité d'*E. coli* y est habituellement plus grande que celle de *Cl. perfringens*. En ce qui concerne le bacille typhique, rarement isolé dans les eaux, il ne doit pas y être très nombreux (Buttiaux, 1951 [2]).

La recherche d'un phage Vi, dont la présence indiquerait la pollution des eaux par le bacille typhique, nécessite l'emploi de souches étalons riches en antigène Vi et peu sensibles aux bactériophages non Vi. De telles souches peuvent contribuer à l'isolement des phages spécifiques en éliminant ceux auxquels elles ne sont pas sensibles. La souche étalon est choisie au moyen de deux épreuves : 1° *étude de la sensibilité d'une souche à l'action de divers bactériophages*, et 2° *étude de nouveaux bactériophages isolés à l'aide de cette souche*.

La souche idéale devrait être lysée uniquement par des phages appartenant à une seule espèce. D'autre part, les nouveaux phages isolés à l'aide de cette souche ne doivent, à leur tour, attaquer que les représentants de cette espèce. On se demande, pourtant, si une souche sensible exclusivement aux phages Vi peut exister et si elle peut conserver longtemps cette spécificité. La possession d'une souche étalon étroitement spécifique vis-à-vis des phages Vi n'exclut pas la possibilité de la voir un jour attaquée par un bactériophage non Vi. C'est pourquoi les souches étalons doivent faire l'objet d'un contrôle constant.

Afin de permettre l'isolement des phages Vi les plus divers, il est préférable d'avoir un ensemble de souches typhiques Vi douées de caractères très particuliers. On comprend l'importance, dans ce cas, d'une détermination des types à l'intérieur des espèces bactériennes, par la recherche des différences de leur sensibilité aux bactériophages. La méthode de lysotypie (ou « phage typing » des auteurs de langue anglaise) permettrait ainsi de constituer un ensemble type pour chaque région. La méthode de lysotypie, dont les principes ont été établis par Craigie et Yen (1938 [5]), a été ensuite développée et appliquée par Felix (1944 [10]), Craigie et Felix (1947 [5]), Scholtens (1950 [31]), Nicolle (1953 [26]), Nicolle, Hamon et Edlinger (1953 [27]). En 1950, Jude [22] a présenté une revue complète de l'antigène Vi.

D'après Nicolle et Hamon (1954 [28]), le type C du bacille typhique est dominant dans les départements du Finistère, du Gard, du Rhône et de la Seine; le type A, dans celui du Nord; le type E, en Loire-Inférieure et Seine-Inférieure; le type F, dans le Bas-Rhin et le groupe I + IV dans les Alpes-Maritimes. Chassagne, dans son étude sur l'évolution de l'épidémie de fièvre typhoïde en France (1953 [3]), note, en ce qui concerne le bacille paratyphique B: « ... si le type Jersey était en cause dans les départements de l'ouest, le type Dundee était, par contre, responsable de l'épidémie de Meurthe-et-Moselle. » D'après Nicolle et Hamon (1954 [28]), le type Dundee de *Salmonella paratyphi* B domine en Meurthe-et-Moselle, en Moselle, dans le Pas-de-Calais, le Rhône, la Seine et la Seine-Inférieure; le type Jersey, dans la Loire-Inférieure et le Maine-et-Loire; le type Taunton, dans le Bas-Rhin et le Nord.

BACTÉRIOPHAGES A GRANDES ET A PETITES PLAGES.

D'après Elford et Andrewes (1932 [8]), une plage formée par le corpuscule phage serait d'autant plus grande que les dimensions de ce corpuscule seraient plus petites.

Nous avons eu l'occasion d'étudier l'activité des bactériophages de *Salmonella* à grandes et à petites plages en 1952 [48]. Autant les premiers ont été spécifiques, actifs exclusivement à l'intérieur de leur espèce, autant les seconds pouvaient être polyvalents, attaquant souvent de nombreux représentants du groupe colityphique-dysentérique.

Une série de bactériophages typhiques à grandes et à petites plages a été de nouveau isolée en 1952. Les isollements ont été effectués dans des eaux de provenance diverse (eaux de la Seine, de la Tamise et de la Méditerranée). Pour la première fois, nous avons réussi à isoler, à l'aide de notre souche étalon, des phages Vi à petites plages. Il nous a semblé intéressant de comparer leur activité avec celle des phages à grandes plages, afin de confirmer les résultats obtenus précédemment.

MATÉRIEL ET MÉTHODE D'ISOLEMENT DES BACTÉRIOPHAGES DANS LES EAUX.

— La souche étalon *Salmonella typhi* Vi 4 (souche Wollman, type F₁) a été utilisée pour l'isolement des bactériophages.

Après ensemencement de cette souche en eau peptonée à 3 p. 100, mélangée à parties égales avec l'eau du prélèvement, le tout est porté à 37° pendant six à huit heures. La culture est chauffée à 56° pendant trente minutes, diluée et étalée à la surface d'une gélose à 1 p. 100 avec 0,1 cm³ d'une culture vivante de bacille typhique de vingt-quatre heures. L'isolement d'un bactériophage à partir d'une seule plage est effectué le lendemain. Le bactériophage subit, après son enrichissement, six nouveaux isollements, afin d'éviter le mélange de plusieurs phages. Cela est important dans le cas d'isolement à partir des grandes plages, dont les dimensions peuvent masquer la présence des bactériophages à petites plages.

Sur 20 bactériophages isolés, 14 ont été à grandes plages et 6 à petites plages. Il nous a été difficile de définir par des méthodes précises, telles que l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration ou l'étude au microscope électronique, les dimensions des phages isolés.

Les bactériophages isolés se divisaient comme suit, d'après l'endroit de leur isolement :

Cinq bactériophages à grandes plages (7, 8, 9, 10, 53) et un bactériophage à petites plages (4), isolés dans la Seine à Epinay ;

Sept bactériophages à grandes plages (12, 13, 14, 15, 16, 52, 54) et un bactériophage à petites plages (5), isolés dans la Tamise ;

Deux bactériophages à grandes plages (11, 51) et quatre bactériophages à petites plages (1, 2, 3, 6), isolés en Méditerranée.

L'activité des bactériophages isolés a été éprouvée vis-à-vis de 47 souches du groupe coli-typhique-dysentérique. Ce sont :

1° Onze souches de *Salmonella typhi* Vi (4, 7, 266, 273, 311, 380, 384, 511, 556, J, B) ;

2° Sept souches de *Salmonella typhi* anciennement Vi positives, mais non agglutinables maintenant par le sérum anti-Vi (301, 330, 365, 384, 403, 512, K) ;

3° Deux souches de *Salmonella typhi* O et H (Lister) ;

4° Souche de *Salmonella paratyphi* A (Kauffmann) ;

5° Treize souches de *Salmonella paratyphi* B (W, P-V, B-V, Ch-Y, 10, 136, 231, 233, 234, 235, 236, 237, 238) ;

6° Souche de Ballerup (Buttiaux) ;

7° Souche de *Shigella dysenteriae* (O) ;

8° Souche de *Shigella flexneri* (Y6R) ;

9° Dix souches d'*E. coli* (Bordet, Bruxelles, Lewis, B, Sh, St, Vc, C16, 36, 304).

La plus grande partie de ces souches nous a été aimablement confiée par M^{me} Grabar, M^{de} Kreguer, R. Buttiaux et P. Nicolle de l'Institut Pasteur. Nous les en remercions vivement.

Les épreuves des bactériophages isolés des eaux à l'aide d'une souche Vi ont confirmé les résultats obtenus en 1952. Tous les bactériophages à grandes plages ont été actifs, exclusivement, sur les souches de *S. typhi* Vi. Les souches typhiques ancienne-

ment Vi (non agglutinables actuellement par le sérum anti-Vi) ont été insensibles à ces phages, ainsi que les souches typhiques O et H, paratyphiques B, *E. coli* et dysentériques.

Par contre, certains phages à petites plages se sont montrés polyvalents et attaquaient des souches autres que le bacille typhique. Les quatre phages isolés en Méditerranée ont été actifs, non seulement sur les différents représentants des *Salmonella*, mais aussi sur les souches dysentériques et *E. coli* (tableau I).

TABLEAU I. — **Activité de bactériophages typhiques isolés dans les eaux de la Seine, de la Tamise et de la Méditerranée.**

47 SOUCHES ÉPROUVÉES	14 PHAGES à grandes plages	PHAGES A PETITES PLAGES					
		I	II	III	IV	V	VI
1° <i>Salmonella typhi</i> Vi (11 souches)	1c	1c	1c	1c	1c	1c	1c
2° <i>Salmonella typhi</i> anciennes Vi (7 souches)	0	1c	1c	0	0	0	1c
3° <i>Salmonella typhi</i> O et H (2 souches)	0	1c	1c	0	0	0	1c
4° <i>Salmonella paratyphi</i> A	0	0	0	0	0	0	1c
5° <i>Salmonella paratyphi</i> B (11 souches)	0	0	0	0	0	0	1c
6° Ballerup (ancien)	0	1c	1c	0	0	0	0
7° <i>Shigella dysenteriae</i>	0	1c	1c	0	0	0	0
8° <i>Shigella flexneri</i>	0	1c	1c	1c	0	0	1c
9° <i>E. coli</i> (10 souches)	0	1c	0	1c	0	0	1c
1c, lyse complète.							

Tous les bactériophages typhiques à grandes plages sont exclusivement actifs sur les souches Vi. Les bactériophages à petites plages (1, 2, 3 et 6) attaquent les représentants de tout le groupe coli-typhique-dysentérique (sur 10 souches d'*E. coli*, 4 seulement ont été attaquées par les bactériophages à petites plages : les souches Bordet, Bruxelles, B et C36).

Les résultats obtenus indiquent donc l'existence, dans les eaux contaminées, de phages à grandes plages (2 à 3 mm de diamètre environ) et de phages à petites plages (0,5 à 0,7 mm de diamètre, environ, dans les conditions de nos recherches), actifs sur *S. typhi* Vi. Les premiers sont spécifiques, tandis que les seconds, souvent polyvalents, peuvent attaquer tout le groupe coli-typhique-dysentérique.

Il est permis de se demander d'après quels caractères l'appartenance d'un bactériophage à une espèce donnée peut être définie. Si nos bactériophages à grandes plages, étroitement spécifiques, peuvent être considérés comme les phages de *S. typhi*, peut-on

en dire autant des quatre bactériophages à petites plages ? Ceux-ci ont été isolés à l'aide d'une souche typhique, mais tous les quatre sont également actifs vis-à-vis de nombreux représentants du groupe entérique. Chacun d'eux, isolé avec une des souches sur lesquelles ils sont actifs, pourrait également être classé parmi les bactériophages coli ou dysentériques, par exemple.

En conclusion, les bactériophages isolés dans les eaux à l'aide des souches de *S. typhi* Vi ne nous renseignent pas toujours sur la présence du bacille d'Eberth, puisque certains d'entre eux peuvent se régénérer sur d'autres souches que les souches typhiques. La pollution des eaux par le bacille typhique est certaine dans le cas seulement d'isolement des phages Vi à grandes plages. Les phages à petites plages doivent, au préalable, être éprouvés quant à leur spécificité.

VARIATIONS SAISONNIÈRES DES BACTÉRIOPHAGES A GRANDES ET A PETITES PLAGES.

La répartition des bactériophages à grandes et à petites plages ne semble pas être liée à des points géographiques précis. On les trouve dans des eaux diverses. Par contre, leur distribution varie suivant les saisons.

Nous avons tenté de comparer la fréquence des bactériophages typhiques à grandes et à petites plages dans certaines eaux (Seine, Tamise, Méditerranée). La recherche de la quantité totale des phages typhiques (ainsi que celle des phages coli) a été pratiquée dans l'intention d'étudier le rapport entre la présence de phages de tailles différentes et le degré de pollution de l'eau. Les eaux de la Tamise ont été particulièrement étudiées du point de vue de la présence d'*E. coli* et de *Streptococcus faecalis* par le Dr Allen, au moyen de la méthode décrite par lui en 1952 [4]. L'analyse chimique de ces eaux a été faite par le Water Pollution Research Laboratory, à Watford (Grande-Bretagne).

Les prélèvements ont été faits au cours des années 1952-1953-1954.

Les eaux de la Tamise ont été prélevées en six points différents sur une longueur de 100 km, en amont et en aval de Londres (Teddington, London Bridge, Blackwall à proximité de la sortie de l'égout de Londres, Hornchurch, Tilbury et Southend).

Les eaux de la Méditerranée ont été prélevées à Nice dans la baie des Anges, en deux points : à cinq mètres environ des côtes et, en mer, à la sortie de l'égout principal de Nice (à environ 100 mètres des côtes).

Les eaux de la Seine ont été prélevées à Epinay, après la sortie de l'égout de Paris.

La quantité de bactériophages dans les divers échantillons d'eau a été recherchée trois jours après leur prélèvement (excepté les prélèvements de la Tamise du mois d'avril, parvenus au laboratoire après un voyage de cinq jours). Ces recherches quantitatives sont donc sur-

tout intéressantes d'un point de vue comparatif (comparaison de la concentration des phages aux divers lieux d'isolement et aux diverses saisons de l'année). La recherche d'*E. coli* et *Str. faecalis* a été effectuée immédiatement après le prélèvement (fig. 1).

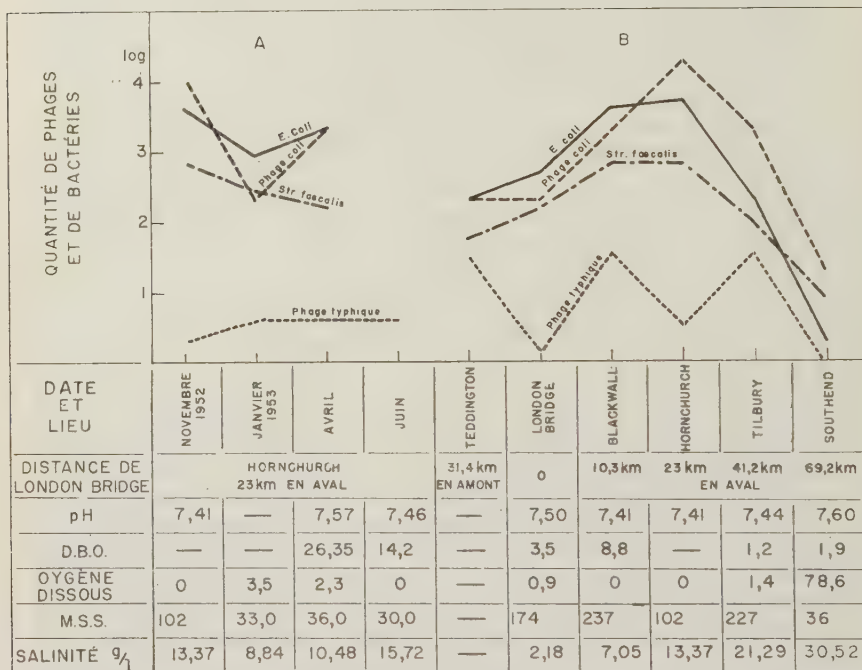


FIG. 1. — Teneur comparée des eaux de la Tamise en « *E. coli* » et « *Streptococcus faecalis* », ainsi qu'en bactériophages typhiques et coli.

A : eaux de la Tamise à Hornchurch en 1952-1953.

B : eaux de la Tamise prélevées en six points différents, le 18 novembre 1952.

D. B. O. : demande biochimique d'oxygène (parties par million) en cinq jours à 20° C.

Oxygène dissous : saturation en p. 100.

M. S. S. : Matières solides en suspension (parties par million).

Salinité : grammes par 1 000 cm³.

MÉTHODE DE RECHERCHE QUANTITATIVE DES PHAGES DANS LES EAUX. — La méthode consiste à déterminer la plus petite quantité d'eau contenant du bactériophage.

1° L'eau est répartie dans les tubes à raison de 20, 10, 5, 1 cm³, ainsi que 1 cm³ de ses différentes dilutions.

2° On ajoute dans chaque tube la même quantité d'eau peptonée, c'est-à-dire 20, 10, 5, 1 cm³, etc. (L'eau peptonée est préparée comme suit : peptone, 30 g ; NaCl 7,5 g ; eau, 1 000 cm³ ; pH, 7,4).

3° Chaque tube est ensemencé avec une culture (souche étalon) de quatre à cinq heures, en bouillon glucosé. La quantité de bactéries introduite est d'environ 2.10^8 par centimètre cube. Un nombre insuffisant de bactéries au départ permettrait le développement facile de germes étrangers présents dans l'eau. Par contre, les bactéries introduites en grande quantité favorisent la fixation immédiate du bactériophage et assurent le développement de la culture.

4° Les tubes sont placés au bain-marie à 37° pendant quatre heures. Un bref séjour à cette température est nécessaire pour éviter le développement trop abondant des germes de l'eau.

5° Après quatre heures, les cultures sont chauffées au bain-marie à 56° pendant trente minutes. Le chauffage à 56° permet d'éliminer les bactéries vivantes de la culture, sans être pour cela obligé d'employer la filtration ou la centrifugation. Le bactériophage résiste bien, en général, à 56° C. La disparition éventuelle d'une partie des corpuscules pendant le chauffage n'altère pas les résultats, car nous recherchons la présence du bactériophage et non sa concentration.

Après le chauffage à 56° , les tubes peuvent être conservés à la glacière jusqu'au lendemain.

6° Au moyen d'une pipette effilée, on dépose, à partir de chaque tube, 1 goutte de la culture chauffée sur une couche de bactéries vivantes (étalées préalablement sur boîtes de gélose à 1 p. 100). On établit les résultats six à huit heures après, en désignant *la plus petite quantité d'eau contenant du bactériophage*. Plus cette quantité est petite, plus forte est la concentration du bactériophage dans les eaux étudiées.

Pour la recherche des bactériophages aérobies, la quantité maximum d'eau examinée est de 20 cm^3 . La dose minimum n'est pas limitée et dépend du degré de la pollution : plus l'eau est polluée, plus fortes seront les dilutions où l'on recherchera le bactériophage.

Pour traduire les résultats en unités permettant de tracer des courbes, nous prenons comme unité la quantité de bactériophage trouvée dans 20 cm^3 d'eau. Dans ce cas, la quantité trouvée dans 10 cm^3 d'eau égale 2 unités ; dans 5 cm^3 d'eau, 4 unités ; dans 1 cm^3 , 20 unités ; dans $0,1\text{ cm}^3$, 200 unités, etc.

Les résultats de nos recherches montrent que la présence de bactériophages à grandes et à petites plages ne semble pas être liée à un point géographique déterminé. On les retrouve dans les eaux de rivière comme dans celles de la mer, au sud comme au nord de la France, sur le continent et dans les Iles Britanniques.

Leur présence est sans aucun rapport avec la quantité totale de bactériophage typhique. Ainsi, dans les eaux de la Méditerranée nous avons constaté, au mois d'octobre et de décembre, une quantité identique de phages typhiques. Or, en octobre, il n'y avait que des phages à petites plages, alors qu'en décembre, seuls les phages à grandes plages étaient présents. Les mêmes faits furent observés dans les eaux de la Tamise, où des bactério-

phages de taille différente ont été présents à la même concentration aux mois d'avril et de juin (fig. 2).

Si la répartition des phages à grandes et à petites plages ne semble pas être liée à des points géographiques déterminés, elle est, par contre, soumise aux variations saisonnières de l'année. Aux mois de novembre, janvier et avril, les eaux de la Seine et celles de la Tamise (aux six points de prélèvement) n'ont présenté que des phages à grandes plages. Au mois de juin, les phages à petites plages ont fait leur apparition dans les eaux de ces deux rivières. Dans la Seine, ils étaient mélangés avec les

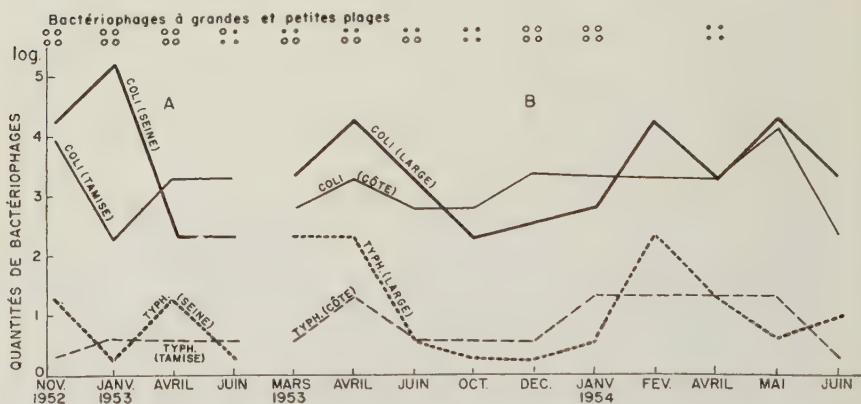


FIG. 2. — Teneur comparée des eaux en bactériophages coli et typhique et variations saisonnières dans l'apparition des phages typhiques à grandes et à petites plages.

A : eaux de la Seine à Epinay et de la Tamise à Hornchurch.

B : eaux de la Méditerranée à Nice, prélevées : a) à 100 m environ des côtes, face à l'égout principal, et b) à 5 m de la côte.

phages à grandes plages ; dans la Tamise, ils se trouvaient à l'état pur.

En ce qui concerne les eaux de la Méditerranée, nous avons constaté qu'au mois de décembre et de janvier, seuls les phages à grandes plages étaient isolés. De mars à juin, ces bactériophages ont été mélangés à des phages à petites plages. Les échantillons du mois d'octobre ne contenaient que ces derniers.

L'apparition des bactériophages à petites plages coïncide donc avec les jours plus longs et ensoleillés. Les phages à grandes plages deviennent alors de moins en moins nombreux, pour réapparaître en hiver. Les changements saisonniers ont une influence certaine sur la répartition des bactériophages typhiques

de tailles différentes. Ces conclusions ne sont valables, bien entendu, que dans les conditions de nos expériences.

LA SURVIE DES BACTÉRIOPHAGES A GRANDES ET A PETITES PLAGES
EXPOSÉS A LA LUMIÈRE DU JOUR.

Les variations saisonnières constatées dans la répartition des bactériophages de taille différente font penser à l'activité de la lumière du jour. Nous avons déjà eu l'occasion d'observer la photosensibilité des bactériophages typhiques Vi et des bactériophages coli dans les conditions du laboratoire (1948, 1955 [15, 19]). Les résultats obtenus avec les prélèvements en Méditerranée sont en faveur de cette hypothèse. C'est au mois de février que nous avons constaté l'apparition de bactériophages à petites plages dans cette région ensoleillée. Les eaux de la Seine et de la Tamise ne renfermaient, à ce moment, que des bactériophages à grandes plages.

La différence dans la survie des bactériophages de taille différente soumis à l'action de la lumière a déjà été observée par Wahl, Rouyer et Guélin. Leurs recherches avaient été précédées par celles d'Eugène Wollman et Lacassagne, qui établirent la résistance inégale des grands et des petits bactériophages aux rayons X (Wollman et Lacassagne, 1940 [35]; Guélin, 1942 [13]; Rouyer et Guélin, 1942 [29]; Wahl, 1946 [34]).

Nous avons ainsi été amenée à rechercher l'influence de la lumière du jour sur la survie des bactériophages à grandes et à petites plages.

TECHNIQUE. — Toutes nos expériences ont été faites au laboratoire de l'Institut Pasteur de Paris, au cours des mois de janvier à juillet 1954 (avec les deux bactériophages typhiques « Watford » à grandes et à petites plages, isolés dans la Tamise en 1952).

Les filtrats bactériophagiques ont été dilués avec de l'eau physiologique, afin d'avoir chaque fois 100 000 corpuscules par centimètre cube (la faible quantité de bouillon introduite avec les dilutions du filtrat a été égale dans toutes les expériences). Les dilutions sont ensuite réparties dans deux tubes en verre ordinaire, de 17 mm de diamètre, à raison de 10 cm³ par tube.

Un tube sur deux est exposé à la lumière sur l'appui de la fenêtre (sur fond blanc), toujours vers 18 heures. Le second tube, témoin, est placé au même endroit, mais enfermé dans une boîte de carton, tapissée de papier noir à l'intérieur.

La fenêtre se trouve au 3^e étage, côté nord; l'arrivée de la lumière n'est empêchée par aucun bâtiment. Le soleil apparaît de côté, tard dans l'après-midi.

Les résultats de nos observations montrent que la survie des phages à petites plages (exposés à la fenêtre pendant vingt-quatre

heures consécutives) n'est pas la même aux différentes époques de l'année et varie avec la saison :

Janvier.	100 p. 100 de phages sont conservés.
Février.	100 p. 100 de phages sont conservés.
Avril.	66 p. 100 de phages sont conservés.
Mai.	25 p. 100 de phages sont conservés.
Juillet.	5 p. 100 de phages sont conservés.

Ce n'est pas la température qui est la cause principale de la disparition de ces phages pendant les trois derniers mois, bien que ce facteur ne soit pas négligeable. Ainsi, Emilianowicz, étu-

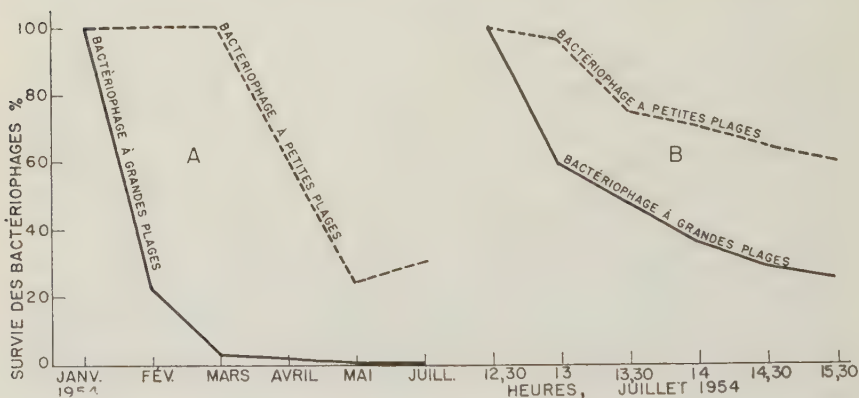


FIG. 3. — Survie comparée des bactériophages typhiques à grandes et à petites plages exposés à la lumière du jour.

A : survie de phages à grandes et à petites plages pendant vingt-quatre heures, au cours de mois différents, en 1954.

B : survie de phages à grandes et à petites plages pendant trois heures, au mois de juillet 1954.

La survie des bactériophages typhiques n'est pas la même aux différentes époques de l'année. Leur disparition est plus rapide en été que pendant les mois d'hiver. Les bactériophages à grandes plages sont plus sensibles à la lumière que les bactériophages à petites plages.

diant en 1952 les phages Vi dans l'eau, conclut que leur survie dépend en premier lieu de la température. Dans nos expériences, le bactériophage témoin, gardé à la même température, mais à l'abri de la lumière, conservait mieux son titre :

Au mois d'avril, 100 p. 100 au lieu de 66 p. 100 chez le phage exposé à la lumière.

Au mois de mai, 88 p. 100 au lieu de 25 p. 100 chez le phage exposé à la lumière.

En comparant la survie des bactériophages de taille différente, nous avons constaté que les phages à grandes plages étaient

plus sensibles à l'action de la lumière. Après vingt-quatre heures d'exposition à la fenêtre, il en restait 20 p. 100 au mois de février et 4 p. 100 seulement au mois de mars ; au lieu de 100 p. 100 aux mêmes époques chez le bactériophage à petites plages (fig. 3 A).

Nous avons suivi heure par heure la disparition des deux bactériophages typhiques (Watford, à grandes et à petites plages) exposés à la lumière, le 30 juin 1954. A cette période de l'année, la survie des bactériophages est très limitée. La journée a été claire et ensoleillée, mais les tubes n'ont pas été éclairés directement par le soleil. Pour avoir une température constante, les deux tubes ont été placés dans un récipient contenant de l'eau refroidie à 10° C. L'expérience a été commencée à 12 h. 30 (heure de Paris). Dès les trente premières minutes, la disparition du phage à grandes plages a été plus marquée que celle du phage à petites plages (40 p. 100 au lieu de 3 p. 100). Après trois heures, le titre du bactériophage à grandes plages n'était plus que 25 p. 100 du titre initial. Chez le phage à petites plages, 60 p. 100 des corpuscules se sont conservés pendant le même temps (fig. 3 B).

La disparition du bactériophage exposé à la lumière varie aussi avec les heures de la journée. L'expérience a été faite le 29 mai 1953, par une journée assez claire, mais sans soleil, le ciel étant uniformément couvert. Les tubes étaient placés dans un récipient contenant de l'eau à température constante (15° C). Le bactériophage à petites plages « Seine » a été utilisé. Dans les conditions de notre expérience, la disparition des corpuscules phages a été plus rapide le matin qu'à la fin de l'après-midi :

De 11 à 12 heures la survie du bactériophage à été de 19 p. 100.
De 15 à 16 heures la survie du bactériophage à été de 21 p. 100.
De 18 à 19 heures la survie du bactériophage à été de 66 p. 100.

De 11 à 13 heures la survie du bactériophage à été de 9 p. 100.
De 15 à 17 heures la survie du bactériophage à été de 18 p. 100.
De 18 à 20 heures la survie du bactériophage à été de 47 p. 100.

Les résultats obtenus confirment nos recherches précédentes sur la photosensibilité du phage coli (1955 [19]). La lumière du jour semble être, en grande partie, responsable de la disparition des phages typhiques des eaux. Les bactériophages à grandes plages surtout sont sensibles à son action.

Ces observations permettent de comprendre l'apparition intermittente de bactériophages à grandes et à petites plages dans les eaux de la Seine, de la Tamise et de la Méditerranée, observée au cours des années 1952-1953. Pendant les journées peu lumineuses de l'hiver, la disparition du bactériophage à grandes

plages est ralentie. Leur nombre empêche l'isolement d'autres bactériophages, en raison surtout des dimensions volumineuses de leurs plages qui masquent les petites. Il est possible que l'introduction simultanée de bactériophages de taille différente et en quantité inégale pendant leur enrichissement, provoque l'augmentation d'un seul phage, l'autre étant éliminé. Le phénomène de l'« exclusion mutuelle », observé par Delbrück et Luria en 1942 [7], peut ainsi expliquer l'absence du bactériophage à petites plages pendant les mois d'hiver.

L'augmentation de l'intensité lumineuse pendant la saison d'été s'accompagne de la diminution quantitative des bactériophages à grandes plages. Leur présence n'interfère plus avec le développement des phages à petites plages, lesquels, à mesure que les premiers disparaissent, deviennent de plus en plus nombreux.

Ceci n'est qu'une hypothèse pour expliquer les variations saisonnières constatées dans la répartition des phages Vi à grandes et à petites plages à la surface des eaux polluées. La question reste ouverte en ce qui concerne la différence entre la photosensibilité des bactériophages de taille différente.

Nos observations ne concernent que les couches d'eau situées près de la surface. Buttiaux (1951 [2]) conseille de faire les prélèvements d'eau destinés à la recherche du bactériophage à une profondeur plus grande. Il est possible que les eaux prélevées en profondeur et inaccessibles aux rayons solaires contiennent, quelle que soit la saison, des bactériophages de taille différente. Des recherches inédites (faites par nous au cours de l'été 1943 dans la Seine au barrage de Suresnes) ont permis de constater la présence de bactériophages à plages volumineuses à une profondeur de 3 m, alors que l'eau de la surface ne contenait que des bactériophages à petites plages.

RÉSUMÉ.

1° Les eaux polluées contiennent des bactériophages typiques à grandes et à petites plages. Les premiers sont étroitement spécifiques, très nombreux pendant les mois d'hiver. Les seconds souvent polyvalents sont surtout isolés en été.

2° L'absence des bactériophages typiques à grandes plages pendant les mois d'été est la conséquence probable de leur sensibilité à la lumière du jour. Par contre, très nombreux en hiver, ils empêchent l'isolement des phages à petites plages.

3° La pollution des eaux par *Salmonella typhi* Vi peut être envisagée après l'isolement dans ces eaux des phages Vi à grandes plages seulement. Les phages à petites plages doivent être préalablement étudiés quant à leur spécificité.

Grâce à l'amabilité de M. le professeur Trégouboff, Directeur de la Station Zoologique de Villefranche-sur-Mer, nous avons pu avoir régulièrement des échantillons d'eau prélevés en Méditerranée. L'isolement de certains bactériophages a également été fait à Villefranche, dans son laboratoire. Nous le remercions très vivement de son accueil et de ses suggestions qui nous ont été très utiles.

Le Water Pollution Research Laboratory, à Watford (Grande-Bretagne), a assuré la recherche d'*E. coli* et de *Streptococcus faecalis*, ainsi que l'étude biochimique des eaux de la Tamise. La recherche des bactériophages dans les mêmes eaux a pu être réalisée grâce aux prélèvements faits par ce laboratoire. Nous en sommes très reconnaissante à M. le Dr B. A. Southgate, Directeur de ce laboratoire, et nous remercions particulièrement le Dr L. A. Allen dont la participation active et les vastes connaissances nous ont permis d'élargir le cadre de nos recherches.

Nous remercions également le Dr L. Coin, Auditeur au Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, qui, avec son amabilité coutumière, nous a fourni les échantillons d'eau de Seine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. A. ALLEN, PASLEY et PIERCE. *J. gen. Microbiol.*, 1952, **7**, 257.
- [2] R. BUTTIAUX. *L'analyse bactériologique des eaux*. Flammarion, édit., Paris, 1951.
- [3] P. CHASSAGNE. *L'eau*, 1953, n° 4.
- [4] J. CRAIGIE et K. F. BRANDON. *J. Path. Bact.*, 1936, **43**, 233.
- [5] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canad. publ. Hlth. J.*, 1938, **29**, 448 et 484, cité d'après Nicolle.
- [6] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **252**, 823.
- [7] M. DELBRÜCK et S. LURIA. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 111.
- [8] W. J. ELFORD et C. ANDREWES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 446.
- [9] W. EMILIANOWICZ. *Bull. State Inst. Marine trop. Med. in Gdansk, Poland*, 1952, **4**, 331.
- [10] A. FELIX. *Brit. med. Bull.*, 1944, **2**, 269.
- [11] A. FELIX et PITT. *Lancet*, 1934, **2**, 186.
- [12] CH. GERNEZ-RIEUX, R. BUTTIAUX et G. MUCHEMBLÉ. *Acta Hydrobiol., Limnol., Protistol.*, 1949, **1**, 105.
- [13-19] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1942, **68**, 245 ; 1947, **73**, 508 ; 1948, **75**, 485 ; 1950, **78** et **79**, 78 et 186 ; 1952, **82**, 78 ; *Trav. Assoc. intern. Limnologie*, 1955, **12**, 687.
- [20] A. GUELIN et J. LE BRIS. *Ces Annales*, 1947, **79**, 508.
- [21] S. G. GUERMAN. *Tr. Inst. Hyg. Saratov*, 1948, **4**, 378.
- [22] A. JUDE. *Biol. Méd.*, 1950, **39**, 318.
- [23] E. N. MICHOUTINE et M. I. PERTZOVSKAJA. *Microorganismes et auto-épuration du sol*. Acad. Sci. U. R. S. S., 1954.
- [24] J. MORZYCKI, M. MORZYCKA et J. GEORGIADES. *Bull. State Inst. Marine trop. Med. in Gdansk, Poland*, 1952, **4**, 91.

- [25] M. MORZYCKA et J. GEORGIADIS. *Bull. State Inst. Marine trop. Med. in Gdansk, Poland*, 1952, **4**, 4.
- [26] P. NICOLLE. *Rev. Hyg. Méd. soc.*, 1953, **1**, 194.
- [27] P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER. *Biol. Méd.*, 1953, **42**, 437.
- [28] P. NICOLLE et Y. HAMON. *Rev. Hyg. Méd. soc.*, 1954, **2**, 424.
- [29] M. ROUYER et A. GUELIN. *Ces Annales*, 1942, **68**, 485.
- [30] R. Th. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1936, **36**, 452 ; *Zbl. Bakt.*, 1937, **139**, 467.
- [31] R. Th. SCHOLTENS. *Ant. v. Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 245.
- [32] V. SERTIC et N. BOULGAKOFF. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 35.
- [33] A. P. VDOVENKO et A. A. MARGO. *J. Microbiol., Epidem., Immunol.*, 1941, **5-6**, 150.
- [34] R. WAHL. *Ces Annales*, 1946, **72**, 284.
- [35] E. WOLLMAN et A. LACASSAGNE. *Ces Annales*, 1940, **65**, 5.

INHIBITORY PHENOMENA OF FILTRATES OF YOUNG CULTURES OF TUBERCLE BACILLI (BCG)

RELATIONSHIP TO BACTERIOPHAGE, LYSOGENIC AND COLICINIC ORGANISMS (*).

By Sol Roy ROSENTHAL and Beatrice HEAGAN (**).

*(University of Illinois, Institution for Tuberculosis Research;
Research Foundation;
Chicago Municipal Tuberculosis Sanitarium. Chicago, Illinois.)*

During the course of a study on the life cycle of tubercle bacilli (BCG, Bacillus Calmette and Guérin) employing shadow casting with chromium and viewing under the electron microscope (Rosenthal and Heagan [4]) there appeared from time to time in young cultures, 29 to 44 hours old, spherical bodies which surrounded the bacilli in a manner reminiscent of bacteriophage or virus (pl. I, fig. 1). Suspecting that this phenomenon might be related to bacteriophage, the following experiments were performed.

METHOD.

Young cultures (usually 29 to 44 hours old, depending upon the strain used) of tubercle bacilli (BCG) grown on potato slants (seeped in 5 p. 100 glycerinated beef bile) were removed from the surface of the potato with a platinum spatula and suspended in Youmans fluid media plus 0.5 % bovine albumin V and gently rotated to break up the large clumps. The suspension was incubated at 37° C for 18 to 24 hours and then filtered through a Seitz or Berkefeld (W) filter. To serve as controls, glycerine bile potato media were incubated for the same period of time as above, and the surface of the potato was scraped with a spatula and the resultant material was suspended in Youmans fluid media and filtered in a similar manner as described. These filtrates were subjected to the following procedures:

A. Effect on the growth of suspensions of BCG of varying concentrations in fluid and on solid media for plaque formation.

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} octobre 1954.

(**) Aided partly by USPHS grant # G788.

B. Effect of concentrated filtrates on the growth of suspensions of BCG. Concentration was achieved by (1) freeze drying, (2) alcohol precipitation and (3) centrifugation.

C. Action on young growing cultures of BCG in liquid or solid media.

D. The effect of ultra-violet light on the filtrates.

E. The production of antibodies in rabbits.

F. Shadow casting with chromium and viewing with the electron microscope.

G. Pattern of precipitation or floatation by the ultra centrifuge.

H. Chemical analysis for nucleic acid.

A. — EFFECT ON THE GROWTH OF SUSPENSIONS OF BCG OF VARYING
CONCENTRATIONS IN FLUID
AND ON SOLID MEDIA FOR PLAQUE FORMATION.

Usually the surface growth of one potato was added to 15 ml of Youmans medium. To the filtrate a suspension of BCG was added so that the final concentration of the organism was 0.01 mg/5 ml, 0.1 mg/5 ml and at times up to 2 mg/5 ml (weight determined by Hopkins tube). The suspension was then tubed in 5 ml amounts and incubated at 37°. Control filtrates were seeded with similar amounts of the organism. Approximately ten tubes for each filtrate was made. Readings were taken at 4 to 5 days intervals and the amount of growth recorded. Considered were the diameter and density of the growth at the base of the tube, the growth through the body of the fluid and the surface growth. Each of these factors is of arbitrary value (five was the value given for maximum growth) and the per cent of inhibition as compared to the controls was averaged for the entire experiment at any given time considering the growth in the controls as 100 %. This method was justifiable since there was a uniformity of growth in all the tubes of a given procedure. Suspensions of the filtrates plus organism were also inoculated in 0.2 ml amounts on Löwenstein's egg solid media and incubated.

Tables I and II depict the per cent of inhibition to 0.01 mg per 5 ml and 0.1 mg per 5 ml of BCG. With the 0.01 mg per 5 ml inoculum, in 3 of 12 experiments, there was complete inhibition for the entire period of incubation (up to 31 days and over). The control tubes of the same experiment had profuse growth. Twenty-five per cent or more inhibition was found in eighty per cent or better in all the experiments. In the series where 0.1 mg per 5 ml inoculum was used, there was 70 to 80 % inhibition (25 % or more inhibition) throughout the entire period of incubation. Complete inhibition was found in only 1 of 17 experiments

TABLE I. — Inhibition of growth of attenuated tubercle bacilli (BCG) by Seitz filtrates of young cultures of the homologous strain.
(0.01 mg of organisms per 5 ml of filtrate of media added.)

DAYS	No exps. *	No 25 % + inhibition	%	No 100 % inhibition	%
5-9	5	4	80	4	80
10-15	10	9	90	3	30
16-20	10	9	90	3	30
21-25	11	8	82	2	18
26-30	11	8	82	2	18
31 +	12	10	83	3	25

* Average 10 tubes to each experiment.

TABLE II. — Inhibition of growth of attenuated tubercle bacilli (BCG) by Seitz filtrates of young cultures of the homologous strain.
(0.1 mg of organisms per 5 ml of filtrate of media added.)

DAYS	No exps *	No 25 % + inhibition	%	No 75 % + inhibition	%
5-9	15	11	73	3 (1)	20
10-15	16	15	94	3	19
16-20	17	16	94	1	6
21-25	12	12	100	3	25
26-30	7	7	100	1	14

* Average 10 tubes to each experiment.
(1) No complete inhibition.

and then for the 5 to 9 days reading only. In both the experiments, although 25 % or more inhibition was found throughout, the higher degree of inhibition (75 % or better) was manifest only from 5 to 9 days after which time the inhibition decreased. With the greater inoculum, up to 2 mg per 5 ml in 43 experiments, only 15 or 35 % showed 25 % or more inhibition; 12 or 28 % showed 50 % inhibition or more. One was complete for 8 days. In 16 experiments, there was no inhibition whatsoever.

Repeating the experiment but using a Berkefeld filter (W) instead of a Seitz filter and inoculating the filtrate with 0.1 mg of BCG per 5 ml of Youmans medium gave practically the same results for similar inocula with Seitz filtrates (table III). This would in part rule out the possibility of adsorption as occurs with phage or virus when Seitz filters are used.

TABLE III. — Inhibition of growth of attenuated tubercle bacilli (BCG) by Berkefeld filtrates of young cultures of the homologous strain.
(0.1 mg of organisms per 5 ml of filtrate of media added.)

DAYS	No exps. *	No 25% + inhibition	%	No 75-100 % inhibition	%
5-9	11	6	54	1 (1)	9
10-15	14	8	57	3 (1)	21
16-20	14	7	50	4 (1)	28
21-25	8	4	50	2 (1)	25
26-30	5	3	60	1	20

* Average 10 tubes to each experiment.
(1) No complete inhibition.

The filtrate which had caused inhibition of growth, if refiltrated through a Seitz filter would retain this property on repeated refiltrations (5 times in the largest number of refiltrations tried). In some instances, the inhibiting power was slightly enhanced, but as a rule it remained constant; occasionally it was lost completely. Diluting filtrates which had caused inhibitory activity serially 1:2, 1:4, etc., resulted in a loss of inhibitory ability after a dilution of 1:2.

To determine whether or not the action of the filtrates on BCG suspensions was bacteriostatic or bacteriocidal, 0.2 ml amounts of mixtures of the filtrate plus BCG suspension which had shown inhibition were planted on Löwenstein's egg media. There were variations from no growth to single colonies appearing after 17 to 22 days of incubation. Controls showed abundant growth beginning at 7 days. Tubes of the former that failed to grow 19 days after inoculation were reinoculated with 0.01 mg of BCG, and showed definite growth 10 days later. No plaques were noted.

B. — EFFECT OF CONCENTRATED FILTRATES ON THE GROWTH OF SUSPENSIONS OF BCG.

The methods used were freeze-drying, alcohol precipitation and high speed centrifugation. In all instances, the control filtrates were treated in the same manner and at the same time. The degree of inhibition was expressed as above as a percentage of the growth that occurred in the control tubes, the latter being considered as 100 %.

1. FREEZE-DRYING. — The filtrates were concentrated 4 times by first shell freezing in alcohol at -45°C and drying in vacuo. In 5 experiments, the filtrates were inoculated with 0.1 mg per

5 ml and in one experiment, 0.01 mg per 5 ml. In 5 of 6 experiments (83 %), there was 50 % inhibition or more. Three of the five had complete inhibition for at least a portion of the time of the inhibition period. In one, there was complete inhibition for the entire duration of incubation of 25 days. Thus, there was an increased inhibition as compared to non concentrated samples, but it was not proportional to the degree of concentration.

2. ALCOHOL PRECIPITATION. — The method employed was that recommended for mumps virus concentration using 21 to 25 % methyl alcohol by volume. A four-fold concentration was accomplished. In 4 experiments, using 25 % methyl alcohol and an inoculum of 0.1 mg per 5 ml, only 1 gave an inhibition of 50 % or more. In 3 experiments using 15 %, 21 %, 25 % alcohol, respectively, with inocula of 1.2 to 2.3 mg per 5 ml, there were none with 50 % inhibition. For the entire series, therefore, 1 of 7 experiments or 14 % inhibited growth to the extent of 50 % or more.

3. CENTRIFUGATION. — The filtrates were centrifugated at 16 000 revolutions per minute under refrigeration. The supernatant was pipetted off (the upper 2/3) and the remainder was used for inoculation of the BCG suspension (0.01 mg to 1.7 mg per 5 ml). Of 8 experiments, none showed inhibition as compared to the control not centrifuged specimens. This is not surprising in retrospect, as the possibility exists that the active principle might have been in the supernatant and was discarded.

C. — ACTION ON YOUNG GROWING CULTURES OF BCG IN LIQUID OR SOLID MEDIA.

The filtrates which, when mixed with BCG suspensions had inhibited growth, were added either as such or after centrifugation (supernatant used) in one drop, ten drops and 2 ml amounts to growing cultures 1 to 7 days old of BCG in Youmans or Dubos media. The age of the filtrate-vaccine mixture was also varied (from 4 to 20 days). In 1 of 9 experiments, where 2 ml of the filtrate was added to a 5 day old Dubos BCG culture, some clearing was noted in 3 of 4 tubes for a period of 3 days, a suggestion of clearing being first noted at 24 hours. This suspension was transferred in 2 ml amounts to 1 day old Dubos BCG cultures and reinoculations of this filtrate was continued every 24 to 48 hours for 5 reinoculations. These mixtures were added to 2 day old BCG Dubos cultures. There was no clearing or inhibition noted, except as mentioned. The sub-culturing

did not enhance the inhibitory or lysing property. Spreading filtrates (3 drops to 0.3 ml) over young growing cultures (7 day old Löwenstein's or Youman's solid media) of BCG failed to inhibit growth or produce plaques. Similarly, no plaques or inhibition was noted when the filtrate was added to a 4 to 5 day old Dubos BCG culture and 0.2 ml of the mixture was seeded on egg media.

D. — THE EFFECT OF ULTRA VIOLET LIGHT ON THE FILTRATES.

The filtrate in 1 000 micron thickness films were exposed to rays of 253 Å to 1848 Å for 1/3 second (courtesy of Dr Franz Oppenheimer). Control filtrates were treated in a similar way. Of 4 such experiments, 1 each had an increase in its inhibitory action, 2 a decrease and 1 showed no change. Under the conditions of this experiment, therefore, the results are equivocal.

E. — THE PRODUCTION OF ANTIBODIES IN RABBITS.

Rabbits were inoculated with filtrates concentrated 4 times by freeze-drying. Control filtrates were treated in a similar manner. The animals were inoculated in the following manner: by intravenous route, 1 ml, 2 ml and 3 ml, each dose 2 times in that order, inoculations being carried out 3 times a week. At the same time, 1 ml was given intramuscularly. The injections were carried out for three weeks. A second series of 2 injections of 2 ml intravenously and 1 ml intramuscularly for 9 injections followed the first series. The animals were bled 1 week after the last injection. The serum collected from these animals was added to Youmans (without albumin) media in 10 % amounts, and the serum media was inoculated in the usual manner. Inhibition occurred in all these experiments as compared to the control rabbit serum media. Therefore, there was no inhibition by the serum of the action of the inhibitory agent.

F. — SHADOW CASTING WITH CHROMIUM
AND VIEWING WITH THE ELECTRON MICROSCOPE.

Filtrates from young cultures (16 to 58 hours old), filtrates plus vaccine mixtures of varying ages (1 to 20 days), as well as the corresponding controls were viewed under the electron microscope after shadow casting with chromium. The preparations were made of the filtrates or the combination of filtrates plus vaccine, etc., with and without centrifugation. Both the sediment and the supernatant were viewed. In addition to the usual

controls as given above, Youmans media itself was used. The actual method of shadow casting utilizing collodion covered screens is described elsewhere [2]. Some 111 such individual experiments were carried out. The results were inconsistent. In only 6 experiments could spherical bodies be seen (pl. I, fig. 2) varying in size from 50 to 110 millimicrons. These were found in uncentrifuged filtrates, in supernatant of an inhibited filtrate vaccine combination 30 days old, a sediment of filtrate vaccine combination 6 days old, etc. The corresponding controls, that is, filtrates of the media or filtrates of the media plus vaccine, as a rule, presented amorphous material (pl. I, fig. 3). However, spherical bodies were not found in the great majority of the experiments (95 %), including the one where centrifugation was carried out at 59 000 revolutions per minute in the Spinco ultracentrifuge. Likewise, some of the control filtrates, but especially filtrates plus vaccine presented suggestive formations which did not entirely rule out the possibility of artefacts. The granules as seen in pl. I, fig. 1 were not considered as artifacts. No Tween was used in the culture media as in the studies of Werner [3]. Also, the appearance of these bodies differed from artifacts described by Werner. The possibility that the bodies in question were adsorbed on the Seitz filter pads must be considered since these were used in the great majority of the experiments. Of special interest was the appearance of some of the bacilli that had failed to grow in the presence of the filtrate. Such organisms appeared as ghosts. At other times, they were swollen, distorted, but most frequently, no vestige of organisms could be found.

G. — PATTERN OF PRECIPITATION AND FILTRATION BY ULTRA CENTRIFUGE.

This work was done by Dr F. W. Putnam of the University of Chicago. The filtrate in 0.1 ionic strength phosphate buffer at pH 6.45 did not show movement or sedimentation of the boundary at 12 590 R. P. M. for 20 minutes (fig. 1 *a, b, c*). This would normally rule out the particles of 50-110 m μ described above. With increased speed (24 630 R. P. M.) movement of the boundary did occur indicating the possibility of smaller particles than mentioned above (fig. 1 *d, e*). However, if these bodies had a high fat or wax content, a floatation effect would offset the one of sedimentation. That this is a possibility is suggested by Lembke [4], who found that the internal granules of the tubercle bacillus by chemical and ultra violet absorption studies contain nucleic acid bound with phosphatides and acetone soluble « wax ».

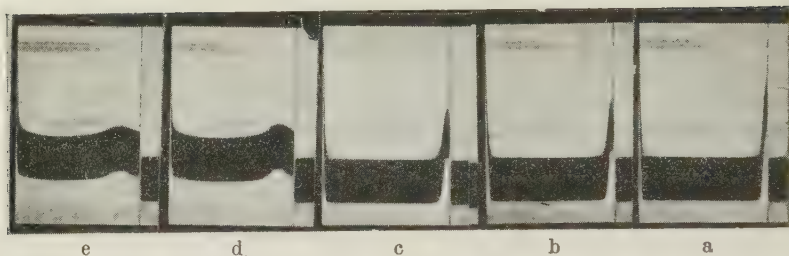


FIG. 1. — *a, b, c* : Sedimentation velocity diagram of filtrates of tubercle bacilli (BCG) in 0.1 ionic strength phosphate buffer pH 6.45, photographed after 4, 8, and 16 minutes (12,590 R.P.M.). Note that there is no movement of the boundary; *d, e* : Sedimentation velocity at 24,630 R.P.M. after 8 and 32 minutes. Note movement of boundary.

H. — CHEMICAL ANALYSIS FOR NUCLEIC ACID.

The filtrates used in the ultracentrifuge were examined chemically by Dr Kozloff of the University of Chicago for nucleic acid, who reported that 36 % was in the form of ribonucleic acid, as determined by the pentose content. This analysis is likewise of a preliminary nature and needs further study, especially to determine the fat content which may help explain the movement in the ultracentrifuge (as described above).

DISCUSSION.

The phenomenon reported is one in which filtrates of young cultures of an attenuated tubercle bacilli (BCG) grown on bile potato media inhibited the growth of homologous culture either partially or completely in better than 80 % of the trials. This phenomenon was also found when the cultures were grown on plain potato (with saline) and on Sauton media. Prolonged trituration of these cultures before filtration nullified the inhibitory effect. Seitz or Berkefeld (W) gave similar results. The nature of this inhibition is not known. The possibilities are: 1. that it may be related to bacteriophage; 2. that it may have a colicine-like activity or that it is a phenomenon not yet described.

As to its phage-like characteristics, the filtrate inhibits growth, but does not produce lysis of growing organisms. There is no concentration on passage. By the methods used, no plaques were formed, and likewise, no neutralizing antibodies were produced in rabbits. The finding of spherical bodies adsorbed to tubercle bacilli which suggested the idea of a bacteriophage could not be developed into an establishment of a relationship between these bodies and the inhibitory phenomenon. Such bodies could

be separated from the bacilli by filtering through a Seitz or Berkefeld filter on only rare occasions (5 % of the trials). The possibility that these bodies may have been adsorbed into the Seitz filter pads which was the method most frequently employed, exists. Whether these small granules are similar to the microgranules described within the cell by Ruska et al. [5] (also Lembke [4], Werner [3]) cannot be answered at this time. No attempt was made to determine if the strain was lysogenic [6]; but if that were so, and the phage were liberated in the early stage of the cycle of the organism, the same analysis as given above would apply to exclude the usual type of phage-like activity.

As to its colicine-like activity, both cause inhibition, but the one here described is transferable, whereas colicine is not. Colicine is found in old cultures or with death of the cell as following heat and ultra violet [7], but the one described here is found in young living cultures.

The phenomenon may be one which has not yet been described. An attractive theory is that it may be bound up with the normal growth of this organism. The idea was suggested when spherical bodies were noted surrounding organisms of young cultures (See pl. I, fig. 1). In this cycle a large granular form was also described which was up to 1 micron in diameter and was thought to be the progenitor of a new bacillus [4]. The possibilities arose that either one was dealing with the origin of a phage or that one had an antagonist in the normal growth cycle of the organism. The filtration separated the antagonist from the protagonist, and by augmenting the antagonist in a young growing culture of the organism, one was able to inhibit the growth of this culture.

CONCLUSIONS.

Filtrates of young cultures of attenuated tubercle bacillus (BCG) are antagonistic to the growth of homologous organisms. Whether this inhibitory phenomenon is related to phage-like activity or is part of the normal growth cycle of the organisms is discussed.

We wish to thank Bessie Reed and Mr. Philpot for their operation of the electron microscope, and Dr Carlos I. Reed for his advice.

BIBLIOGRAPHY

- [1] S. R. ROSENTHAL and B. HEAGAN. *Ces Annales*, 1955, **88**, 479.
- [2] C. I. REED, S. R. ROSENTHAL and B. P. REED. *Ces Annales*, 1948, **75**, 504.

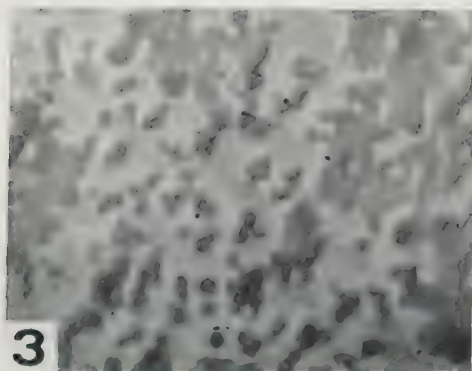
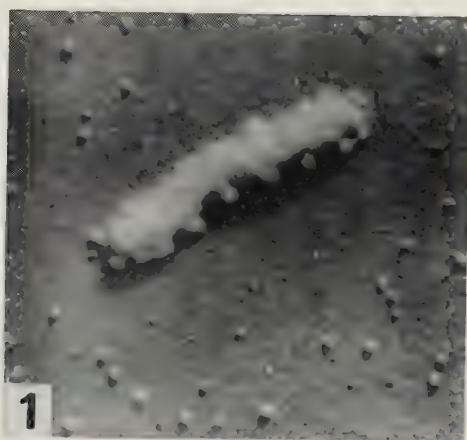
- [3] G. H. WERNER. *Electron Microscopic Studies of the Cellular Morphology of the Tubercle Bacillus in Tuberculosis Research IV*: S. Karger, édit., Bâle, 1951.
- [4] A. LEMBKE. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1947, **152**, 239.
- [5] H. RUSKA, A. LEMBKE and J. CHRISTOPHERSEN. *Klin. Wschr.*, 1940, **19**, 217.
- [6] A. LWOFF. *Ces Annales*, 1951, **81**, 370.
- [7] P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 728.

EXPLANATION OF THE PLATE

FIG. 1. — Tubercle bacillus (BCG) surrounded by spherical bodies, many of which seem to be adsorbed to the bacillus. Shadow casted with chromium and viewed under the electron microscope (approximately $\times 30,000$).

FIG. 2. — Spherical bodies in filtrates from young cultures of tubercle bacilli (BCG) shadow casted with chromium and viewed under the electron microscope. Size 85 to 110 $m\mu$ by direct measurement or projected and measured on a screen (approximately $\times 27,000$).

FIG. 3. — Filtrates of Youmans media shadow casted and viewed under the electron microscope showing amorphous material (approximately $\times 27,000$).



ÉTUDE CRITIQUE DE DIVERSES MÉTHODES UTILISÉES POUR APPRÉCIER L'ACTIVITÉ D'UN VACCIN ANTI-TYPHOÏDIQUE

M^{me} J. GRABAR et M^{me} S. LE MINOR (*).

(*Institut Pasteur, Service des Vaccins.*)

Depuis la préparation des premiers vaccins, leur activité est éprouvée sur des animaux. Or, on ne peut effectuer de titrage véritable du vaccin antityphoïdique, comme c'est le cas pour les vaccins antitoxiques ; nous ne pouvons parler d'unités, ne possédant pas d'animal réactif comme pour les toxines diphtérique et tétanique. De plus, il ne faut pas oublier que l'homme est le seul être naturellement sensible à l'infection typhoïdique. Ces deux faits limitent sérieusement la valeur des épreuves faites sur animal. Enfin, malgré les techniques dans l'ensemble assez uniformes, chaque chercheur effectue ces épreuves suivant des protocoles différents et les résultats obtenus dans divers laboratoires sont difficilement comparables.

C'est la raison pour laquelle nous nous étions proposé d'étudier comparativement le vaccin de l'Institut Pasteur et certains autres vaccins.

Mais au cours de ce travail, certaines observations que nous rapportons ci-dessous nous ont fait abandonner le but initial. C'est finalement une critique des méthodes ordinairement utilisées dans l'étude des vaccins antityphoïdiques que nous avons été amenées à faire. Les résultats que nous rapportons doivent donc être interprétés moins dans le but d'en tirer une conclusion sur la valeur de tel ou tel vaccin que dans celui de montrer les différences suivant leur préparation, les techniques employées et leur interprétation.

Nous avons effectué ce travail avec les trois vaccins suivants :

I. — Vaccin chauffé de l'I. P. qui, rappelons-le encore une fois, est une récolte en eau physiologique de la culture de plusieurs souches lisses de *S. typhi*, chauffée une heure à 56° sans antiseptique [3].

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 janvier 1955.

II. — Vaccin de l'armée anglaise, d'après Felix, préparé avec la souche Ty2 tuée par l'alcool. Nous avons obtenu ce vaccin grâce à l'obligeance du Dr Felix, que nous remercions [7].

III. — Vaccin tué et desséché par l'acétone, préparé à l'Army Medical School, Washington, que nous devons à l'obligeance du Dr Landy. Ce vaccin est préparé avec la souche Ty2 [15].

Epreuves *in vitro*.

Les examens *in vitro* peuvent être divisés en deux groupes :

- 1° Etude des souches qui entrent dans la fabrication du vaccin ;
- 2° Etude du vaccin lui-même.

1° SOUCHES. — Nous rappellerons brièvement que les souches qui entrent dans la fabrication d'un vaccin antityphoïdique doivent être lisses et posséder les antigènes vaccinaux connus jusqu'ici : O et Vi. La mise en évidence de ces antigènes est faite par l'épreuve d'agglutination des souches sur lame et en tubes vis-à-vis des sérums spécifiques. Le résultat obtenu sur lame est strictement qualitatif. En tube, il dépend de l'agglutinabilité de la souche. Comme exemple nous citerons les différences obtenues avec les souches Ty2, Watson et Ty6-S vis-à-vis du même sérum anti-Vi, les trois souches étant en forme O inagglutinable [6].

Felix [9] conseille l'emploi d'une méthode quantitative basée sur l'absorption préalable des sérums par les souches à l'étude. Mais les résultats obtenus par cette méthode n'ont qu'une signification relative, car l'appréciation du pouvoir absorbant de l'antigène Vi est faite comparativement à la souche Ty2 prise comme souche test, connue pour son pouvoir agglutinant exceptionnel.

L'appréciation photométrique de l'opacité des extraits trichloracétiques microbiens a montré trop de fluctuations d'une préparation à une autre avec la même souche pour qu'on l'adopte comme méthode vraiment quantitative. Nous estimons qu'elle est surtout utile pour éliminer les souches rugueuses ou en voie de le devenir. L'étude et le titrage chimique des polysides [21] fourniront peut-être des renseignements plus précis sur la richesse quantitative en antigènes des différentes souches. Pour le moment, cette méthode est encore dans le domaine de la recherche.

Contrôlées avant chaque fabrication, les souches du vaccin anti-typhoïdique de l'I. P. [3], sont en forme lisse et possèdent les antigènes O et Vi. Elles correspondent aux types phagiques le plus souvent rencontrés dans les régions où ce vaccin est utilisé (France, Afrique, Proche-Orient ; pour l'Extrême-Orient nous préparons un vaccin composé de souches locales).

La souche Ty2 utilisée dans la préparation des vaccins anglais et américain est décrite dans le dernier travail de Felix sur le vaccin anti-typhoïdique [8].

2° VACCIN. — Le vaccin de l'I. P. étudié dans ce travail est celui préparé avec les souches de France, d'Afrique et du Proche-Orient (I). Il a été étudié comparativement au vaccin anglais (II) et au vaccin américain (III) :

a) *Par la méthode d'agglutination* en tubes en présence des sérums spécifiques anti-O et Vi, le vaccin étant l'antigène. Tous les échantillons ont été ramenés au même nombre de germes par millilitre (500 millions) et les agglutinations lues après deux heures d'étuve à 37° et vingt heures à la température du laboratoire. Le sérum anti-O provient de l'immunisation de lapins avec la souche O 901 ; le sérum anti-Vi est obtenu par l'immunisation des lapins avec la souche Ballerup. Nous avons utilisé comme suspension O celle qui nous sert couramment pour les séro-diagnostic. Pour l'agglutination Vi nous utilisons une suspension au Cl_2Ca préparée avec la souche T6 S, tuée par le formol [2]. Voici près de deux ans que nous employons cette méthode de préparation de la suspension Vi et elle nous a donné entière satisfaction quant à sa sensibilité, spécificité et surtout stabilité. Les résultats sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I.

	I	II	III	SUSP. O	SUSP. Vi
Sérum anti-O	3 200	800	800	6 400	0
Sérum anti-Vi	20 ±	400	200	0	3 200

L'agglutination faite avec les germes lavés deux fois et remis en suspension dans l'eau physiologique nous a donné les mêmes titres Vi pour les échantillons II et III. Les germes de l'échantillon I n'étaient plus agglutinés dans le sérum anti-Vi même à la dilution du 1/10.

b) *Par la méthode de précipitation.* — L'épreuve de précipitation a été faite sur le surnageant des vaccins prélevé après centrifugation. Le surnageant de l'échantillon II contenait trop d'alcool et donnait de fausses réactions (précipitation dans les tubes témoins avec du sérum normal). L'échantillon III étant préparé au moment de l'emploi, ainsi qu'il est préconisé pour l'utilisation de ce vaccin, a donné un surnageant limpide : toute réaction faite avec lui est restée négative.

Par contre, le surnageant de l'échantillon I (vaccin chauffé) est fortement opalescent et la précipitation faite avec le sérum anti-Vi allait jusqu'à la dilution de l'antigène au 1/128 ; vis-à-vis du sérum anti-O, la réaction était positive à la dilution de l'anti-

gène au 1/64. Précisons que les sérums employés pour ces réactions sont des sérums agglutinants et faiblement précipitants.

c) *Par la méthode d'hémagglutination* [46]. — Cette réaction est peut-être la plus sensible pour déterminer la présence des antigènes dans les surnageants des vaccins, mais elle est aussi la moins quantitative, car on sait qu'il suffit de très peu d'antigène pour sensibiliser les globules rouges [5]. Cette réaction n'a pu être faite, pour les mêmes raisons que ci-dessus, qu'avec le surnageant du vaccin I. Le titre obtenu allait jusqu'au taux limite des sérums utilisés, 1/6 400 pour le sérum anti-O et 1/3 200 pour le sérum anti-Vi.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

De ces examens *in vitro* avec trois échantillons différents de vaccin, nous pouvons conclure que les antigènes O et Vi qui étaient présents dans les souches avant leur traitement (chauffage, alcool ou acétone) le sont également dans les vaccins, mais sous forme différente. Par la méthode d'agglutination nous avons pu constater que dans les vaccins II et III, ces antigènes restent fixés sur la cellule microbienne. Par contre, si par l'agglutination on peut mettre en évidence l'antigène O des corps microbiens de l'échantillon I, l'antigène Vi n'est décelable que dans son surnageant par les réactions de précipitation et d'hémagglutination. Il est vrai que le chauffage à 56° C inhibe l'agglutinabilité des suspensions microbiennes Vi.

Ainsi il existe une différence très nette entre les diverses préparations.

Pour confirmer la présence des antigènes O et Vi dans le vaccin chauffé, nous avons injecté à des souris d'une part les germes lavés, d'autre part le surnageant du vaccin I.

Les souris ont été vaccinées par trois injections faites à une semaine d'intervalle. Les germes lavés ont été injectés par deux voies différentes, sous-cutanée et intrapéritonéale, à raison de 0,1, 0,2 et 0,3 ml d'une suspension à 1 milliard de germes. Le surnageant a été injecté uniquement par voie sous-cutanée. Injectées par la voie intrapéritonéale avec le surnageant seul, même dilué au demi, les souris ont succombé en quelques heures. Les doses ont été les mêmes que pour les germes. Dix jours après la dernière injection, nous avons titré par hémagglutination les anticorps O et Vi. Voici les résultats que nous avons obtenus avec des globules rouges de mouton sensibilisés par des surnageants de cultures chauffées de *S. typhi* O 901 et d'*E. coli* Vi (tableau II).

Si l'on compare les titres obtenus avec les germes lavés et ceux obtenus avec le surnageant, on voit que la réponse en aggluti-

TABLEAU II.

SÉRUM DES SOURIS APRÈS INJECTION DE	O	Vi
Germes i.p.	320	10
Germes s.c.	80	10
Surnageant s.c.	640	160

nines O et Vi est nettement supérieure chez les souris ayant reçu le surnageant. L'antigène Vi du surnageant a conservé son pouvoir agglutinogène chez la souris.

Epreuves sur l'animal.

Avec les trois types de vaccins, nous avons immunisé des souris et des lapins. Nous avons recherché la réponse en agglutinines O et Vi dans les sérums des animaux immunisés, l'immunité active de la souris et l'immunité passive obtenue avec les sérums des lapins expérimentés sur souris et embryon de poulet [44].

A. — IMMUNISATION ACTIVE DE LA SOURIS.

Technique. — a) Le vaccin de l'I. P. (I) et le vaccin à l'acétone américain (III) ont été ramenés à la teneur de 1 milliard de germes au millilitre et dilués à raison de 1:5, 1:50 et 1:500.

Trente souris du poids moyen de 18 g ont reçu en injection intrapéritonéale 0,5 ml de ces dilutions à raison de trois injections, une tous les sept jours. Avant chaque injection, nous avons prélevé du sang dans les sinus caverneux de l'œil des souris afin de rechercher les agglutinines. Une semaine après la dernière injection, nous avons injecté par voie *intrapéritonéale* une suspension de la souche Ty2 contenant 200 millions de germes vivants sous le volume de 0,5 ml. La même suspension est injectée à 5 témoins.

b) Le vaccin de l'I. P. (I) et le vaccin à l'alcool anglais (II), une fois ramenés à 1 milliard de germes au millilitre, ont été dilués à 1:50, 1:500, 1:5 000 et 1:50 000. La vaccination de 20 souris, aux mêmes intervalles que ci-dessus, a été effectuée par voie *sous-cutanée*, sous le volume de 0,1, 0,2 et 0,3.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION.

1° RECHERCHE DES AGGLUTININES. — Les résultats des agglutinations et de l'hémagglutination faites avec les sérums mélangés des souris du même lot sont donnés dans le tableau III. Elles n'ont été faites que dans l'expérience a.

TABLEAU III.

Dilution des vaccins	Agglutination microbienne						Hémagglutination					
	O			Vi			O			Vi		
	1 ^{ère} sem.	2 ^e sem.	3 ^e sem.	1 ^{ère} sem.	2 ^e sem.	3 ^e sem.	1 ^{ère} sem.	2 ^e sem.	3 ^e sem.	1 ^{ère} sem.	2 ^e sem.	3 ^e sem.
I 1/5	0	0	0	0	0	—	0	40	—	0	10	—
I 1/50	0	0	0	0	0	0	0	40	40	0	5	5
I 1/500	0	0	0	0	0	0	0	5	—	0	0	—
III 1/5	0	0	0	10	40	—	0	40	—	20	40	—
III 1/50	0	0	0	5	40	40±	0	20	20	10	40	40
III 1/500	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0	40	20

Les hémagglutinations ont été faites avec des dilutions de sérums commençant au 1/5, 1/10... ; les agglutinations microbiennes O ont été faites avec des dilutions terminales du sérum au 1/50, 1/100, les agglutinations microbiennes Vi aux dilutions 1/5, 1/10...

Le 0 indique une agglutination négative.

Le signe —, l'épreuve n'a pas été faite par manque de sérum.

Pour des raisons matérielles (difficultés de prélèvement du sérum en quantité suffisante), nous n'avons pas pu examiner tous les lots de sérum. Mais nous avons néanmoins pu constater l'apparition des agglutinines O et Vi, ces dernières surtout chez les souris vaccinées avec le vaccin III. Les agglutinines O semblent apparaître plus tardivement que les agglutinines Vi. Toutefois, nos dilutions ne commençant, pour l'agglutination microbienne, qu'au 1/50, nous n'avons peut-être pas décelé les titres inférieurs.

D'autre part, il semble que l'apparition des agglutinines soit en rapport avec le nombre de germes injectés. Ainsi, la dilution du vaccin desséché à 1 : 500 n'a provoqué l'apparition des agglutinines Vi et O qu'à partir de la seconde injection. Relevons aussi la grande sensibilité de la réaction d'hémagglutination pour la recherche des agglutinines Vi [8, 20].

2° PROTECTION ACTIVE DE LA SOURIS. — Les résultats sont donnés dans le tableau IV : le vaccin I a été inoculé à deux reprises : une fois comparativement avec le vaccin II, une autre fois avec le vaccin III.

D'après ce tableau, le vaccin I et le vaccin III ont, dans les conditions de l'expérience (administration du vaccin par voie intrapéritonéale, épreuve faite sept jours après la dernière injection), une activité comparable chez la souris. Nous n'avons pas pu recommencer cette épreuve avec des dilutions plus grandes de vaccin, n'ayant plus de vaccin tué par l'acétone à notre disposition. Par contre, l'administration du vaccin à l'alcool et du vaccin chauffé par voie sous-cutanée révèle une différence dans l'immunisation active de la souris, l'épreuve étant faite sept jours après

la dernière injection du vaccin. Mais si l'on compare les résultats obtenus avec le vaccin I introduit une fois par voie sous-cutanée à doses croissantes, une autre fois par voie intrapéritonéale à dose fixe, il n'y a aucune différence dans le comportement des souris jusqu'à la dilution du vaccin 1 : 500.

TABLEAU IV.

48 heures après épreuve avec Ty2	Dilution des Vaccins														
	I	I	I	I	II	II	II	II	I	I	I	III	III	III	
	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{50000}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{50000}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{500}$	
mortes	1	3	4	8	0	1	0	2	0	0	5	0	0	5	
vivantes	18	16	16	9	18	18	18	17	28	27	19	26	28	29	

Témoins dans les deux épreuves : 5 mortes, 0 vivantes.

DISCUSSION DES RÉSULTATS DES ÉPREUVES SUR LA SOURIS. — La souris est couramment employée pour l'étude de l'immunisation par un vaccin antityphoïdique, malgré le fait que le bacille typhique ne soit pas naturellement pathogène pour cet animal. La majorité des chercheurs qui utilisent cette épreuve emploient comme souche-test la souche Ty2. Cette souche utilisée depuis de nombreuses années tue les souris, même de race différente, entre les mains de divers chercheurs avec la même régularité à la dose de 80 millions à 100 millions de germes (D. L. 100), sans mucine. Ce fait peut donner à l'épreuve une certaine valeur comparative par son uniformité. Mais avec la souche Ty2 l'épreuve sur la souris ne donne que la mesure de la protection antitoxique, le nombre de germes étant trop élevé et la mort trop rapide (vingt-quatre à quarante-huit heures) pour que l'on puisse envisager une protection antivirulence. Les échantillons des vaccins anglais et américain que nous avons éprouvés sont préparés avec la souche Ty2, celui de l'I. P. ne contient pas cette souche : l'épreuve est homologue pour les deux premiers, elle est hétérologue avec le vaccin de l'I. P.

Nous avons pu constater une différence nette entre le vaccin à l'alcool et celui de l'I. P. dans l'immunisation active de la souris, à condition de faire l'épreuve sept jours après la dernière injection. Elle est due en partie à l'utilisation de la souche Ty2 dans l'épreuve, mais aussi à la localisation différente des antigènes : les antigènes O et Vi sont fixés sur la cellule microbienne dans les vaccins II et III, alors qu'ils sont, pour le vaccin I, dans le surnageant, surtout l'antigène Vi. Nous verrons plus loin, dans les épreuves sur lapin, que cette localisation motive aussi des variations dans le temps, fait dont nous n'avons pas tenu

compte chez la souris, ayant appliqué les techniques habituellement adoptées pour cette épreuve.

La comparaison des résultats des deux expériences faites avec le vaccin de l'I. P. aux mêmes dilutions (1/500) montre que la voie d'introduction du vaccin ne semble pas jouer, pour la souris, un rôle important. D'ailleurs, le travail récent de Mac Leod [47] doit nous mettre en garde de vouloir conclure sur une immunisation efficace des souris, même lorsque le germe est pathogène pour cet animal, si l'épreuve de contrôle est faite par voie artificielle. Or, le bacille typhique n'est pas naturellement pathogène pour la souris et les doses mortelles de germes vivants sont injectées par voie intrapéritonéale.

Nos résultats nous permettent de conclure que les trois vaccins éprouvés ont gardé leur pouvoir vaccinant pour la souris après les différents modes de stérilisation. Rappelons que pour Felix [8] l'épreuve de l'immunisation active de la souris serait la moins sensible et devrait seulement être utilisée pour éliminer les vaccins qui n'auraient aucun pouvoir immunisant.

Signalons, enfin, que les sérums des souris vaccinées avec les dilutions au 1:5, 1:50 et 1:500 des échantillons I et III ont été éprouvés sur l'embryon de poulet [41], mais aucun n'a protégé ce dernier. Cette observation semble indiquer que les souris ainsi vaccinées ne formeraient pas d'anticorps circulants protecteurs pour l'embryon. Nous avons pensé que ce résultat négatif était dû au fait que, pour avoir des sérums stériles, nous étions obligées de filtrer sur bougie les sérums dilués au 1/10. Or nous avons vu [42] que les sérums d'hommes vaccinés ne protégeaient pas non plus l'embryon de poulet, après filtration sur bougie. Filtrés sur membrane, les sérums des souris, contrairement à ce que nous avons vu chez l'homme, ne protégeaient pas davantage. Devant ce résultat, nous avons inoculé à des souris, suivant la même technique, une souche vivante, T 556. Les sérums de ces souris étaient également dénués de pouvoir protecteur pour l'embryon de poulet. Nous nous proposons de reprendre l'étude de cette question, ici nous ne faisons que signaler ce fait.

B. — IMMUNISATION DES LAPINS.

Nous avons procédé ensuite à l'immunisation des lapins avec les trois lots de vaccins à l'étude. Avant les inoculations, les sérums de tous les lapins ont été éprouvés dans le but de déceler les agglutinines naturelles. Tous ceux qui en avaient ont été éliminés. Une fois l'immunisation terminée, chaque sérum a été titré par agglutination microbienne ou hémagglutination. Le pouvoir protecteur des sérums a été évalué : 1° par protection passive sur la souris ; 2° par protection de l'embryon de poulet.

I. — IMMUNISATION DES LAPINS AVEC LE VACCIN CHAUFFÉ DE L'I. P.
ET LE VACCIN A L'ACÉTONE DESSÉCHÉ AMÉRICAIN.

Quatre lapins (deux pour chaque vaccin) ont été immunisés par *voie sous-cutanée* à raison de trois injections, à une semaine d'intervalle, de 1 ml, 2 ml et 4 ml d'une suspension à 1 milliard de germes par millilitre.

Parallèlement, les mêmes doses, et aux mêmes intervalles de temps, ont été injectées par *voie intraveineuse*, à quatre autres lapins.

Dix jours après la dernière inoculation, ces lapins ont été saignés stérilement et leurs sérums examinés.

RÉSULTATS.

a) AGGLUTINATION MICROBIENNE ET HÉMAGGLUTINATION. — Avec le vaccin à l'acétone nous avons eu, suivant la voie d'inoculation, des titres différents d'agglutinines Vi. Ainsi, tandis que le titre des agglutinines O était sensiblement le même chez les animaux immunisés par les deux voies d'inoculation (1:1 600 s. c. et 1:3 200 i. v.), les agglutinines Vi n'ont pu être décelées que dans les sérums de lapins qui ont été chargés par voie intraveineuse. Leur titre a été de 1:320, alors que chez les lapins vaccinés par voie sous-cutanée il était inférieur à la dilution finale du sérum au 1:5, aussi bien par la méthode d'agglutination microbienne que par l'hémagglutination.

Le vaccin chauffé n'a pas provoqué l'apparition d'agglutinines Vi dans les sérums des lapins vaccinés, ni par voie sous-cutanée ni par voie intraveineuse. Le titre des agglutinines O était de 1:3 200 par voie sous-cutanée et 1:6 400 par voie intrapéritonéale.

b) PROTECTION DE L'EMBRYON DE POULET. — 0,1 ml d'une dilution au 1/10 des sérums des lapins immunisés par voie intraveineuse avec le vaccin chauffé a protégé l'embryon de poulet contre 650 germes de la souche Ty 556, tandis que la même quantité de sérum des lapins immunisés, par la même voie, avec le vaccin à l'acétone a protégé contre 2 750 germes. La dose mortelle 50 p. 100 était chez les témoins de 50 germes au millilitre.

L'épreuve faite avec les sérums des lapins vaccinés par voie sous-cutanée a donné des résultats assez semblables : 1 600 germes pour le vaccin à l'acétone et 570 germes pour le vaccin chauffé.

c) IMMUNISATION PASSIVE DE LA SOURIS. — *Technique.* — Dans cette épreuve nous n'avons utilisé que les sérums des lapins immunisés par voie intraveineuse.

Des lots de cinq souris ont été inoculés par voie intrapérito-

néale avec 0,5 ml des quatre sérums dilués au 1:2, 1:4, 1:8 et 1:16. Une demi-heure après, ces souris ont reçu par voie intrapéritonéale 0,5 ml d'une suspension de la souche Ty2 titrant 200 millions de germes au millilitre. Les souris témoins ont reçu 0,5 ml d'eau physiologique et une demi-heure après, 0,5 ml de la même suspension microbienne. Nous avons fait cette épreuve comparativement à l'injection du sérum par voie intramusculaire la veille et la dose de Ty2 par voie intrapéritonéale le lendemain. Devant le résultat identique obtenu par les deux méthodes, nous avons adopté la première, c'est-à-dire l'injection du sérum par voie intrapéritonéale suivie, une demi-heure après, par celle de la suspension Ty2.

RÉSULTAT.

Quatre souris témoins sur 5 sont mortes dans les vingt-quatre heures qui ont suivi l'inoculation de la suspension Ty2. Les sérums des lapins vaccinés par le vaccin à l'acétone ont protégé les souris jusqu'à la dilution du 1:16, tandis que les sérums des lapins immunisés par le vaccin chauffé ont protégé les souris jusqu'à la dilution du 1:8.

II. — IMMUNISATION DES LAPINS PAR LES VACCINS CHAUFFÉ ET A L'ALCOOL.

Les immunisations des lapins ont été faites d'après la technique de Felix [8]. Le vaccin à l'alcool que nous avons reçu a été gardé tout le temps au réfrigérateur à +4°. Deux lapins n^{os} 585 et 586 ont été vaccinés par voie intraveineuse, à une semaine d'intervalle, par deux injections à raison de 2 ml d'une suspension à 500 millions au millilitre et 4 ml d'une suspension à 1 milliard au millilitre.

Les mêmes doses, aux mêmes intervalles, du vaccin chauffé préparé à la même date que le vaccin à l'alcool ont été injectées par voie intraveineuse aux lapins n^{os} 583 et 584.

Les lapins ont été saignés à blanc dix jours après la fin de la vaccination.

Mais au cours d'autres expériences nous avons remarqué que le pouvoir protecteur des lapins subissait des changements dans le temps. Avec le reste du vaccin à l'alcool nous avons chargé par la même technique deux autres lapins, n^{os} 718 et 719, et deux lapins, n^{os} 716 et 717, avec le vaccin chauffé.

RÉSULTATS.

1° AGGLUTINATION ET HÉMAGGLUTINATION. — Les sérums des lapins 583 et 584 (vaccin chauffé) ont montré la présence de très

faibles taux d'agglutinines Vi, le premier 1 : 10, le second 1 : 5 \pm , tandis que les agglutinines O ont été de l'ordre de 6 400. Les sérums 585 et 586 (vaccin à l'alcool), par contre, ont donné des titres Vi, le premier de 1 : 320, le second de 1 : 640.

Le titre des agglutinines O a été de 1 : 1 600.

2° IMMUNISATION PASSIVE DES SOURIS. — Les sérums 583 et 584 ont protégé la souris jusqu'à la dilution du 1/8, tandis que les sérums 585 et 586 ont protégé jusqu'à la dilution 1/16. Les souris témoins sont mortes à raison de 4 sur 5 dans les vingt-quatre heures.

3° EMBRYON DE POULET. — Cette épreuve a été faite avec les sérums des lapins n^{os} 716, 717, 718 et 719 que nous avons essayé de garder un an. Nous avons effectué plusieurs épreuves à des périodes différentes, dont les résultats sont donnés dans le tableau V.

TABLEAU V.

Sérums	10 jours	6 semaines	6 mois	1 an
716	< 200 germes	3.000 germes	mort	-
717	< 200 germes	2.500 germes	20.000 germes	> 20.000 germes
718	5.500 germes	2.000 germes	1.000 germes	3.000 germes
719	4.500 germes	2.500 germes	1.000 germes	mort.
Témoins	65 germes	20 germes	20 germes	> 200

III. — IMMUNISATION DES LAPINS PAR LE VACCIN CHAUFFÉ.

Comme nous n'avions plus à notre disposition de vaccin américain ni de vaccin anglais, nous n'avons pas pu injecter à nouveau des lapins en appliquant les techniques qui nous semblaient donner les meilleurs résultats, à savoir : trois injections par voie intraveineuse, les prises de sang étant ensuite faites à dix jours, six semaines, trois mois, six mois et, si possible, un an après la vaccination.

C'est pourquoi nous avons immunisé des lapins par trois lots de vaccin chauffé.

TECHNIQUE ET MATÉRIEL. — Le premier vaccin éprouvé a été préparé un an avant l'épreuve et gardé, pendant ce temps, dans une chambre froide à +4°. Cinq lapins ont été immunisés par ce vaccin à raison de 0,5 ml et 1 ml d'une suspension de 500 millions et une troisième injection de 1 ml à 1 milliard de

germes au millilitre par voie intraveineuse à sept jours d'intervalle. Une fois la vaccination terminée, nous avons prélevé stérilement du sang dix jours, trois mois, six mois et un an après la dernière injection.

Ce sont les lapins n^{os} 765, 766, 767, 768, 769 (mélange I).

Le second vaccin a été préparé six mois avant l'épreuve, gardé dans une chambre froide à 4°. Cinq lapins ont été immunisés comme avec le précédent et le sérum examiné aux mêmes dates.

TABLEAU VI. — Agglutination.

Sérums		Titre 10 j. après la fin de la vaccin- nation	3 mois	6 mois	1 an
Mélange I (1 an)	H	3.200	1.600	1.600	800
	O	3.200	200	200	200
	Vi	neg.	neg.	neg.	neg.
Mélange II (6 mois)	H	1.600	1.600 ±	1.600	200
	O	3.200	200	200	neg.
	Vi	neg.	neg. sauf sér. 772 1/40	neg.	neg. sauf sér. 772 1/5
Mélange III (1 mois)	H	3.200	1.600	1.600	800
	O	3.200	100	100	200
	Vi	neg.	neg.	neg.	neg.

TABLEAU VII. — Séro-protection sur embryon de poulet.

Sérums	10 jours	3 mois	6 mois	1 an
Mélange I (1 an)	1.400 germes	9.500 germes	7.000 germes	2.000 germes
Mélange II (6 mois)	9.500 germes	7.000 germes	3.200 germes	650 germes
Mélange III (1 mois)	5.500 germes	17.000 germes	1.000 germes	800 germes
Témoins	65 germes	20 germes	20 germes	40 germes

Les chiffres indiquent le nombre de germes au millilitre correspondant à la dose létale 50 p. 100.

Ce sont les lapins n^{os} 770, 771, 772, 780 et 774 (mélange II).

Le troisième vaccin provenait d'une fabrication datant d'un mois. Les lapins immunisés de la même façon que les précédents ont été saignés aux mêmes dates que les précédents. Ce sont les lapins n^{os} 776, 777, 778, 781 et 782 (mélange III).

Les sérums de ces lapins ont été éprouvés :

1° Titrage des agglutinines ; 2° protection de l'embryon de poulet. Les résultats sont donnés dans les tableaux VI et VII.

DISCUSSION DES RÉSULTATS DES ÉPREUVES SUR LE LAPIN.

Nos résultats nous permettent de constater tout d'abord le rôle de la voie d'introduction du vaccin. Pour le lapin nous avons utilisé surtout la voie intraveineuse et nous pouvons conclure, en accord avec Felix, que c'est la meilleure voie d'immunisation des lapins quant à la production d'agglutinines. Il est intéressant de noter que le vaccin desséché, administré par voie sous-cutanée, n'a pas provoqué la formation d'agglutinines Vi, tandis que le même vaccin, à la même dose, introduit le même jour par voie intraveineuse, a provoqué l'apparition d'agglutinines Vi à un titre élevé. Le pouvoir protecteur sur œufs des sérums correspondant à ces deux voies d'immunisation était sensiblement le même.

Il est d'usage de saigner les lapins dix jours après la fin de la vaccination, ce que nous avons fait dans l'expérience avec les vaccins desséché et chauffé. Les résultats des expériences suivantes montrent que, d'après le vaccin, le pouvoir protecteur est différent suivant que la prise de sang est faite dix jours après la fin de la vaccination, ou plus tard. Nous ne saurions trop insister sur l'importance de cette observation lors des études des vaccins sur le lapin.

Les études récentes sur l'histologie du foie [10, 14] lors des infections et des vaccinations antityphoïdiques peuvent peut-être permettre d'envisager une action différente de diverses préparations des vaccins. Suivant que les antigènes sont en solution ou fixés sur la cellule microbienne, leur mode de résorption pourrait varier et ce fait expliquerait les différences constatées dans les saignées à des dates échelonnées.

L'étude comparative de trois lots de vaccin chauffé, préparés à des dates différentes, nous permet de constater qu'un vaccin est actif un an au moins après sa préparation. A certains égards (tableau VI) il semble même que le vaccin le plus récemment préparé se comporte, injecté au lapin, comme les vaccins qui ont les antigènes fixés sur les cellules : le pouvoir protecteur apparaît très vite et à un taux élevé, mais il descend aussi plus rapidement. Par son action protectrice, évaluée sur l'embryon de poulet, il se rapproche du vaccin à l'alcool.

Un autre point intéressant à noter est l'influence du nombre des injections. Si l'on introduit le vaccin chauffé à raison de deux injections intraveineuses (exp. vaccin à l'alcool et vaccin chauffé), le pouvoir protecteur du sérum des lapins immunisés pour l'embryon de poulet est nul au bout de dix jours. Par contre, c'est à partir de la sixième semaine qu'il commence à être appré-

ciable (tableau V). Quand nous avons immunisé les lapins (dans l'expérience avec les vaccins chauffés) par trois injections, nous avons pu constater dès le dixième jour un pouvoir protecteur (tableau VII).

Le nombre de germes que nous avons injectés au cours de toutes les vaccinations est sûrement de beaucoup supérieur au nombre de germes nécessaires pour provoquer chez le lapin la production d'anticorps protecteurs. Nous avons immunisé comparativement des lapins avec le vaccin desséché et le vaccin chauffé en utilisant les doses employées dans la vaccination de l'homme et des doses réduites, proportionnelles au poids du lapin : le pouvoir protecteur des sérums pour l'embryon du poulet a été le même ; seul le titre des agglutinines variait. Ces lapins ont reçu trois injections à une semaine d'intervalle et le sérum a été examiné dix jours après. Peut-être aurions-nous pu constater une différence si nous avions procédé à des examens successifs des sérums prélevés à des dates différentes.

Nous ne reviendrons pas sur la discussion de l'utilisation des souris dans l'épreuve de séro-protection passive [11, 12]. Notons seulement que dans les expériences où nous avons fait cette épreuve comparativement à celle sur l'embryon de poulet, cette dernière s'est montrée plus sensible et plus fidèle. Les résultats obtenus sur embryon de poulet permettent de mieux préciser la différence entre les divers lots de vaccins, car c'est bien le pouvoir anti-virulence des sérums des animaux vaccinés que l'on titre par cette méthode.

Discussion générale et conclusions.

Les examens de laboratoire *in vitro* ont montré que les trois préparations de vaccins contiennent les antigènes O et Vi, soit fixés sur la cellule, soit dans le surnageant. La question de savoir si l'antigène O, dans les différentes préparations, est dans un état satisfaisant et s'il stimule la production des anticorps O ne nécessite aucune discussion : on connaît la stabilité de cet antigène lors de différents traitements. Il en est autrement de l'antigène Vi. Le fait que, dans le vaccin chauffé, il ne se trouve pas sur la cellule microbienne, mais dans le surnageant, peut faire supposer une altération de cet antigène lors du chauffage, bien qu'il supporte une température supérieure à 56° [13].

La question est de savoir si le Vi du surnageant des suspensions chauffées est antigène ou haptène [20]. Nous avons pu constater la réponse de la souris en hémagglutinines Vi. Par manque de sérum nous n'avons pas pu faire l'agglutination microbienne. Mais Chi Yen Chu et Hoyt [4] ont fixé sur des globules rouges le surnageant d'une suspension Vi chauffée et ont injecté à des

lapins les globules rouges ainsi sensibilisés. Les sérums de ces lapins agglutinent la suspension Vi microbienne et les globules rouges sensibilisés. La substance Vi contenue dans le surnageant est donc antigène.

La présence des agglutinines Vi dans un sérum ne semble pas toutefois avoir une influence notable sur le pouvoir protecteur. Nous avons signalé ce fait dans un travail antérieur [41]; nous en avons eu encore une fois la confirmation dans les expériences faites avec les vaccins chauffés. A de très rares exceptions, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'agglutinines Vi dans les sérums des lapins. Et néanmoins, le pouvoir protecteur des différents sérums des lapins éprouvés sur la souris (p. 610-611) ne montre pas ici encore de différence appréciable.

L'épreuve de la protection active de la souris a été faite par deux méthodes différentes et il semble que la voie d'introduction du vaccin ne joue pas un rôle important (tableau IV), si on compare les résultats obtenus avec le vaccin chauffé injecté d'une part en sous-cutanée, d'autre part en intrapéritonéale. C'est la préparation alcoolique qui a donné les meilleurs résultats, mais cette épreuve n'a pas été faite en tenant compte du facteur temps.

La protection passive de la souris n'a été recherchée qu'avec les sérums des lapins saignés dix jours après la fin de l'immunisation. Nous n'avons recherché le pouvoir protecteur des sérums prélevés à des dates ultérieures que sur l'embryon de poulet. Nos résultats (vaccin chauffé et vaccin alcoolique, les trois lots de vaccin chauffé) indiquent qu'il y a pour le lapin une différence dans l'apparition et l'évolution du pouvoir protecteur suivant que les antigènes O et Vi sont fixés sur la cellule microbienne ou sont présents dans le surnageant.

Le fait que la protection active des souris par les sérums des lapins immunisés comparativement avec le vaccin chauffé et le vaccin desséché est identique, dans les conditions de notre expérience, et qu'il existe une différence nette dans les épreuves faites avec ces mêmes sérums sur l'embryon de poulet (p. 609) montre que l'on mesure deux choses différentes par ces deux épreuves. L'embryon de poulet étant sensible souvent à l'unité de *S. typhi*, c'est le pouvoir anti-virulence que nous mesurons par cette méthode. Le nombre de germes trop élevé de la souche Ty2, même si elle est O inagglutinable, dans l'épreuve de l'immunisation passive de la souris, indique le pouvoir anti-toxique d'un sérum. Nos expériences montrent que le pouvoir anti-virulence apparaît plus tardivement avec le vaccin chauffé (un mois après la fin de la vaccination), mais il se maintient plus longtemps que celui obtenu avec le vaccin à l'alcool.

Notons cependant, que par manque de vaccin à l'alcool, nous avons fait cette épreuve avec trop peu de lapins pour que le

résultat obtenu ait une valeur absolue. Nous signalons cette différence de comportement à titre d'indication seulement. Au contraire, avec le vaccin chauffé, nous avons pu suivre la courbe du pouvoir protecteur sur un nombre considérable de lapins et les résultats obtenus sont significatifs, même si on tient compte des réactions individuelles éventuelles des lapins.

Quelle est la valeur des résultats de ces épreuves et peut-on les transposer aux réactions de l'organisme humain ? Dans une étude comparative, faite sur le vaccin à l'alcool et l'ancien vaccin chauffé phénolé de l'armée américaine, Miller et coll. [19] ont constaté que toutes les épreuves sur souris et lapins étaient favorables à la préparation alcoolique. Dans la discussion de ce travail, les résultats de laboratoire ont été confrontés aux statistiques humaines, les seules valables pour déterminer la valeur d'un vaccin. Il ne semble pas, d'après les auteurs, que la préparation alcoolique confère une plus grande sécurité à l'homme que ne le faisait l'ancien vaccin chauffé phénolé. Les publications de Marmion et coll. [18] et d'Anderson et coll. [1] rapportent des observations du même genre.

D'après nos résultats, nous pouvons constater le pouvoir vaccinant de différentes préparations, ainsi que leur mode d'action sur la souris et le lapin. Mais il nous semble hasardeux de vouloir déterminer la valeur d'un vaccin pour l'homme d'après les épreuves faites sur l'animal. Les deux rongeurs, la souris et le lapin, qui servent dans les épreuves d'immunité, sont tous les deux réfractaires au bacille d'Eberth et on peut se demander si leur comportement vis-à-vis de ce bacille ou de son vaccin peut être transposé à l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. S. ANDERSON et H. G. H. RICHARDS. *J. Hyg.*, 1948, **46**, 164.
- [2] K. ANDO et H. SHIMOJO. *Bull. O. M. S.*, 1953, **9**, 575.
- [3] A. BONNEFOI et J. GRABAR. *Bull. Acad. Med.*, 1949, **133**, 172.
- [4] D. CHI-YEN-CHU et R. E. HOYT. *J. Hyg.*, 1954, **52**, 100.
- [5] P. CORVASIER. *Ces Annales*, 1952, **83**, 173.
- [6] A. FELIX. *J. Hyg.*, 1938, **38**, 750.
- [7] A. FELIX. *Brit. med. J.*, 1941, **4**, 391.
- [8] A. FELIX. *J. Hyg.*, 1951, **41**, 268 (voir en particulier les descriptions des techniques et méthodes).
- [9] A. FELIX et R. M. PITT. *J. Hyg.*, 1951, **49**, 92.
- [10] S. FUGIMASSI et K. HASEGAWA. *Acta Path. Japan.*, 1952, **2**, 64.
- [11] J. GRABAR et S. LE MINOR. *Ces Annales*, 1951, **81**, 528.
- [12] J. GRABAR et S. LE MINOR, *ibid.*, 1953, **85**, 239.
- [13] A. JUDE. *Biol. Méd.*, 1950, **39**, 318.

- [14] K. KYU, N. MATSUONE et coll., *Yokohama Med. Bull.*, 1952, **3**, 326.
- [15] M. LANDY. *Amer. J. Hyg.*, 1953, **58**, 148.
- [16] L. et S. LE MINOR et J. GRABAR. *Ces Annales*, 1952, **83**, 62.
- [17] D. R. E. MAC LEOD. *J. Hyg.*, 1954, **52**, 9.
- [18] D. E. MARMION, G. M. F. NAYLER et I. O. STEWART. *J. Hyg.*, 1953, **51**, 260.
- [19] W. S. MILLER, D. L. CLARK et O. C. DIERKHISING. *Amer. J. trop. Med.*, 1951, **31**, 535.
- [20] J. SPAUN. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1954, **34**, 286.
- [21] A. M. STAUB et R. COMBES. *Ces Annales*, 1952, **83**, 528.

ÉTUDES SUR LES BACTÉRIES LIGNINOLYTIQUES

II. — CARACTÈRES DES BACTÉRIES LIGNINOLYTIQUES ISOLÉES DU SOL

par G. FISCHER, B. BIZZINI, M. RAYNAUD et A.-R. PRÉVOT (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

Dans une communication antérieure [1], nous avons décrit diverses techniques pour l'isolement et l'étude des bactéries ligninolytiques. Nous rapportons dans le présent article les caractères d'une série de souches, dont l'origine est indiquée dans le tableau I.

TABLEAU I.

SOUCHE	ORIGINE
II B.	Sol de forêt de bouleaux, Allemagne.
III B.	Sol de forêt de bouleaux, Allemagne.
IV B.	Sol de forêt de bouleaux, Allemagne.
V B.	Sol de forêt de bouleaux, Allemagne.
X B.	Sol de forêt de bouleaux, Allemagne.
VI F.	Sol de forêt de pins, Allemagne.
21.	Sol de prairies, Garches, France.
22.	Sol adhérent aux racines de <i>Platanus acerifolia</i> .
23.	Sol adhérent aux racines de <i>Fagus sylvatica</i> .
24.	Sol adhérent aux racines de <i>Taxodium sempervirens</i> .
25.	Fèces de cheval.
31 à 40	Sol de prairie, Garches, France.
T	Infection spontanée d'un milieu contenant de la tyrosine comme seule source de carbone.

Toutes ces souches ont les mêmes caractères morphologiques : il s'agit de bactéries mobiles, de petite taille, en forme de bâtonnets ou de coco-bacilles (fig. 1). Leurs dimensions moyennes sont rapportées dans les tableaux II et II bis. Elles sont Gram-négatif. Étudiées à l'état frais au microscope à contraste de phase et par examen sur fond noir, elles se révèlent mobiles, animées d'un mouvement de tournoiement. La coloration par la méthode de Casarès-Gil révèle un seul groupe de cils polaires, parfois réduit à un seul cil (fig. 2). Ces germes sont aérobies.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 janvier 1955.

Ils poussent mal en gélose profonde, dans la zone inférieure. Ils ne poussent pas sur milieu synthétique en tubes scellés sous vide.

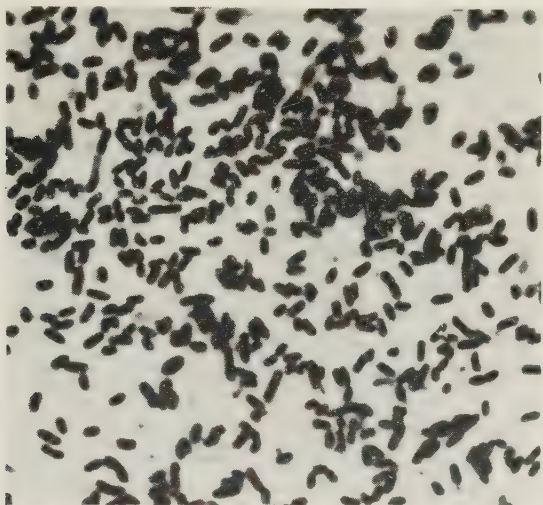


FIG. 1.



FIG. 2.

Leur activité métabolique sur la lignine et sur divers substrats aromatiques se manifeste en présence d'oxygène seulement. Les

TABLEAU II.

SOURCES	MORPHOLOGIE Coloration	DIMENSIONS	CROISSANCE sur milieu Slanier	POMME de terre	GLATINE	SÉRUM COAGULÉ	FIBRINE	GLUCOSE	FRUCTOSE	GALACTOSE	MALTOSE	LACTOSE	SACCHAROSE	AMIDON	GLYCÉRINE	ARABINOSE	NITRATE
T	Cocco- bacilles Gram —	1,7 × 0,8	+++ fl	Beige.	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
A 3-42	Petits bâtonnets Gram —		+++ fl	Jaune.	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+
40	Petits bâtonnets Gram —	2,4 × 0,8	++ f ₁	Brun rouge brillant.	0	0	0	+	0	0	0	0	±	0	0	0	0
III B	Cocco- bacilles Gram —	1,4 × 0,7	++	Brun orangé.	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0
X B	Petits bâtonnets Gram —	2,2 × 0,8	++	Jaune clair brillant.	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
V B	Petits bâtonnets Gram —		+	Jaune.	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IV B	Cocco- bacilles Gram —	1,2 × 0,5	+	Jaune.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II B	Petits bâtonnets Gram —	1,4 × 0,5	+	Jaune.	0	0	0	0	0	+	0	0	±	0	0	0	0
VI F	Petits bâtonnets Gram —		+	Jaune brillant.	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+
21	Petits bâtonnets Gram —	1,4 × 0,7	+	Rouge foncé.	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+

fl : formation d'un pigment fluorescent.

SOCCHES	MORPHOLOGIE Coloration	DIMENSIONS	CARACTÈRES cultureux	POMME de terre	GÉLATINE	SÉRUM COAGULÉ	FIBRINE	GLUCOSE	FRUCTOSE	GALACTOSE	MALTOSE	LACTOSE	SACCHAROSE	AMIDON	GLYCÉRINE	ARABINOSE	NITRATES
22	Cocco- bacilles Gram —	4,2 × 0,7	Stanier I Asparagine Gélosé : B Liquide : nul	Jaune brillant	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+
23	Bâtonnets Gram —	4,8 × 0,8	id. Gélosé : B Liquide : CAB	Jaune- brun brillant	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+
24	Bâtonnets Gram —	4,7 × 1,0	id. Gélosé : B Liq. : Bc,fl	Gris et lie de vin	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
25	Cocco- bacilles Gram —	4,5 × 0,7	id. Gélosé : B Liquide : CM	Jaune marron	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+
31	Bâtonnets Gram —	4,6 × 0,7	id. Gélosé : B Liquide : nul	Jaune beige	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	Bâtonnets Gram —	4,0 × 0,6	id. Gélosé : B Liquide : CAB	Brun orangé	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+
35	Bâtonnets Gram —	1,8 × 0,7	id. Gélosé : B Liquide : nul	Beige pâle	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
38	Bâtonnets Gram —	3,2 × 1,2	id. Gélosé : B Liquide : CAB	Jaune	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
39	Bâtonnets Gram —	2,4 × 0,9	id. Gélosé : B Liquide : nul	Gris	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
33	Cocco- bacilles Gram —	1,4 × 0,7	Id. Gélosé : B Liq. : Bc,fl	Beige orangé pâle	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+

B : bonne croissance ; CAB : croissance assez bonne ; CM : croissance médiocre.

cultures sur milieu synthétique en présence de substrat aromatique sont lentes en culture non agitée (cinq à quinze jours à 30°), alors qu'en culture agitée aérée, on peut obtenir un développement abondant en un à deux jours. En bouillon ordinaire, ces germes poussent en donnant un trouble homogène et abondant. Ils se développent bien en eau peptonée et sur milieu synthétique à

TABLEAU III.

Substrat	Concentration mg/ml	Souche T	Souche A-3-12
Phenol	0,005	0	0
	0,010	0	0
	0,050	0	0
	0,100	0	0
Protocatechate de Na	0,100	0	0
	0,500	+	0 +
	1,000	+++	0
Benzoate de Na	0,100	+++	0
	0,500	+++	+++ fl
	1,000	+++	+++ fl
Catechol	0,100	+++	0
	0,500	±	0
	1,000	0	0
Parahydroxy- Propiophenone (P.O.P.)	0,100	0	0
	0,500	0	0
	1,000	0	0
Parahydroxy- Benzoate (P.H.B.)	0,100	+	±
	0,500	+++	+
	1,000	+++ fl	++ fl

l'asparagine (milieu I de Stanier). Ils donnent pour la plupart un pigment fluorescent, non extractible par les solvants usuels (chloroforme, éther, benzène).

Sur fragments de pomme de terre stérilisés, les colonies sont colorées : la couleur varie suivant les souches (beige, marron, orangé, rouge).

Les caractères culturaux principaux sont rapportés dans les tableaux II et II bis.

Aucun de ces germes ne liquéfie la gélatine. Les fermentations sucrées ont été recherchées sur milieu synthétique additionné de

TABLEAU IV. — Attaque de la phénol-lignine. Milieu A [4] + phénol-lignine. Fioles d'Erlenmeyer de 300 ml, contenant 100 ml de milieu et 100 mg de phénol-lignine au total. Culture non agitée à 30° pendant trois semaines. Dosage de la phénol-lignine résiduelle [2] sur l'ensemble de la culture.

SOUCHE	POURCENTAGE de phénol-lignine attaquée
T.	47,5
<i>Ps. aeruginosa</i> Vallon	67 — 57
<i>Ps. aeruginosa</i> A 22.	84 — 65
<i>Ps. aeruginosa</i> E. F.	80 — 56
<i>Ps. fluorescens putidum</i>	85 — 59
<i>Ps. stutzeri</i>	83 — 56
21.	35
22.	38,8
23.	42
24.	42
25.	38,8
III B.	42,2
IV B.	46
V B.	0
VI F.	30,3

glucide (concentration finale 1 p. 100). L'attaque de sucre a été déterminée par le virage d'un indicateur (rouge de phénol). Les sucres sont attaqués en cultures non agitées, avec acidification et sans dégagement de gaz.

Deux souches, T et A-3-12, ont été étudiées du point de vue de leur aptitude à pousser sur milieu synthétique (Stanier I) addi-

TABLEAU V.

SOUCHE	POURCENTAGE DE LIGNINE ATTAQUÉE			
	Amyl-lignine ou butyl-lignine	Lignine-native	Alcali-lignine	Ammoniaque lignine
T	77	30	18	52,8
A-3-12	28	67	8	—

Même mode opératoire que pour la phénol-lignine.

tionné de divers substrats aromatiques comme seule source de carbone. Les résultats sont rapportés au tableau III.

Ces germes ne poussent pas sur cellulose.

L'attaque de la phénol-lignine en culture a été recherchée pour

TABLEAU VI.

SOUCHE	POURCENTAGE de lignosulfonate de Ca attaqué
T	15,9
25	6,7
VI F)	6,7
39	4,3
40	14

Même mode opératoire que pour la phénol-lignine. On voit que le lignosulfonate de Ca et l'alcali-lignine employés en solution aqueuse vraie sont faiblement attaqués.

toutes ces souches par la technique indiquée précédemment [1]. On trouvera les résultats aux tableaux IV, V et VI.

DISCUSSION. — Les différentes bactéries ligninolytiques qui ont été isolées par nos soins à partir de sols très divers appartiennent au genre *Pseudomonas*. L'étude de leurs caractères cultureux révèle des différences importantes entre elles, portant sur la réduction des nitrates en nitrites, l'attaque des glucides, la couleur des pigments formés sur pomme de terre, etc.

Il nous paraît donc difficile, dans l'état actuel des études de systématique sur le genre *Pseudomonas*, de donner un nom d'espèce à chacune de nos souches.

Ce fait semblait indiquer que la propriété d'attaquer la lignine était une caractéristique du genre *Pseudomonas*, sinon générale, du moins répartie dans ce genre avec une fréquence élevée.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recherché l'activité ligninolytique d'une série de souches de collection. Le tableau IV montre que ces espèces ont aussi une activité ligninolytique manifeste.

On sait, par ailleurs, que les *Pseudomonas* sont très répandus dans les sols. On est donc amené à penser qu'au rôle qui leur était déjà reconnu, il convient d'ajouter une nouvelle fonction : la dégradation de la lignine. Dans les conditions du laboratoire, cette dégradation est un processus très aérobie, qui s'accompagne d'une consommation élevée d'oxygène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. RAYNAUD, B. BIZZINI, G. FISCHER et A.-R. PRÉVOT. Ces *Annales*, 1955, **88**, 454.
 [2] S. A. WAKSMAN et J. I. HUTCHINGS. *Soil Sci.*, 1936, **42**, 119.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE SÉROLOGIQUE DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION DES GLOBULES ROUGES SENSIBILISÉS PAR UN IMMUNSÉRUM

par E. JOCHEM, A. EYQUEM et F. JACQUELINE (*).

*(Institut Pasteur. Laboratoire d'Hématologie et des
Groupes sanguins.)*

Au cours de ces dernières années, les rhumatismes inflammatoires chroniques ont fait l'objet d'études sérologiques utilisant une réaction basée sur l'agglutination des globules rouges sensibilisés par un immunsérum à une dose non agglutinante. Le plus souvent, le système utilisé était constitué par des globules rouges de mouton et un immunsérum de lapin anti-mouton.

Cette réaction a été étudiée, dès 1922, par Meyer, qui a découvert son principe en effectuant des réactions de Bordet-Wassermann avec le sérum de malades atteints de cirrhose hépatique ou de bronchite chronique. Il a examiné d'autres systèmes constitués par des globules rouges de cobaye ou d'homme sensibilisés avec un immunsérum homologue, qui lui ont permis d'obtenir des résultats positifs alors que les globules rouges de bœuf sensibilisés par un immunsérum homologue ne convenaient pas à la réaction.

Il a constaté que le facteur activateur de l'agglutination était indépendant de l'hétéro-agglutinine, car il n'est pas absorbé par les globules rouges non sensibilisés. Il l'est, au contraire, mais difficilement, à l'aide de globules rouges sensibilisés. Ce facteur activateur peut être absorbé à l'aide de globules rouges sensibilisés provenant des différents systèmes donnant un résultat positif. Il résiste à la conservation des sérums à la glacière pendant plusieurs jours. En fractionnant le sérum à l'aide de la méthode de Liefmann au gaz carbonique, Meyer a retrouvé le facteur dans le précipité et le liquide surnageant. Ce facteur résiste au chauffage pendant trente minutes à 56°. Il est détruit, au contraire, par un chauffage de trente minutes à 70°. Il peut également

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 janvier 1955.

être détruit par une agitation prolongée pendant douze heures et après contact avec le venin de cobra pendant deux heures.

Une grande partie des résultats obtenus par Meyer ont été retrouvés au cours des études récentes, après avoir été oubliés pendant de nombreuses années.

Dean (1911) a observé un phénomène que l'on a voulu rapprocher de celui étudié par Meyer, mais qui s'est révélé en réalité différent. Il a constaté qu'une fraction globulinique extraite du sérum de cobaye favorisait l'agglutination des bactéries sensibilisées par un immunsérum, ou d'un sérum normal possédant une agglutinine homologue naturelle.

Ce facteur résiste au chauffage pendant trente minutes à 56° et il est décelable dans le sérum non fractionné de cobaye.

Olsen, à la même époque que Meyer (1922), a de même mis en évidence un facteur activateur favorisant l'agglutination des globules rouges ou des bactéries sensibilisés par un immunsérum homologue. Ce facteur est aussi détruit par le venin de cobra. Pour Olsen, le facteur existe dans le sérum normal et dans la fraction précipitée par le gaz carbonique. Il a observé que les globules rouges de mouton sensibilisés par un immunsérum homologue pouvaient, en présence de sérum de cobaye, présenter une agglutination plus intense si on se servait comme liquide de dilution du sérum de mouton donneur de globules rouges.

Le facteur étudié par Dean et Olsen est en réalité différent de celui observé par Meyer, et n'a pas été recherché dans le sérum humain. Ce dernier n'a pas été étudié jusqu'en 1940, date à laquelle Waaler, le retrouvant, a examiné, à l'aide de la réaction des globules rouges de mouton sensibilisés, le sérum de 77 malades atteints de rhumatisme chronique inflammatoire et a trouvé une réaction positive chez 27 d'entre eux. Waaler observa aussi que ce facteur est thermostable après chauffage à 56° pendant trente minutes. Il n'est pas absorbable par les globules rouges de mouton normaux.

Rose, Ragan, Pearce et Lipman (1948) semblent avoir redécouvert le phénomène par hasard, en effectuant des réactions de déviation du complément pour les rickettsioses et en examinant le sérum d'un sujet atteint de rhumatisme chronique.

Pike, Sulkin et Coggeshall (1949) ont observé une réaction très fortement positive, c'est-à-dire caractérisée par un rapport très élevé entre les titres des deux agglutinines vis-à-vis des globules rouges normaux et des globules rouges sensibilisés, chez des malades atteints de formes actives de polyarthrite chronique évolutive. Il y a cependant une certaine relation entre le résultat de la réaction et l'état clinique du malade. Ces résultats étaient en accord avec ceux observés par Jawetz et Hook, mais différaient

de ceux de Bauer et Giansiracusa. Pike et Sulkin utilisent des globules rouges de mouton sensibilisés avec un sérum de lapin anti-mouton. Le facteur résiste à la conservation du sérum à la glacière, pendant plusieurs mois. Ces auteurs signalent qu'on peut mettre en évidence dans le sérum de sujets normaux, un facteur activateur de faible titre après absorption des hétéro-agglutinines. Ils ont donc tendance à considérer le facteur activateur comme un constituant normal du sérum. La nature de cette réaction reste pour eux mystérieuse et son mécanisme n'est pas élucidé. Le facteur existe dans les globulines du sérum et ne prend une valeur notable que chez les rhumatisants. Ce facteur est différent des hétéro-agglutinines et il n'est pas absorbé par les globules rouges de monton normaux, par le rein de cobaye ou les globules rouges de bœuf bouillis. Il ne se fixe sur les globules rouges sensibilisés que d'une manière très faible, car il est éliminé par les lavages des globules rouges. Il n'a pas le pouvoir d'activer l'hémolyse des G. R. sensibilisés.

En utilisant d'autres systèmes de G. R. et de sérums homologues, différents auteurs ont observé que le sérum de malades atteints de rhumatismes chroniques pouvait favoriser l'agglutination et que le facteur activateur était révélablé à l'aide de certains de ces systèmes. Ainsi, on peut obtenir des résultats positifs à l'aide de G. R. de mouton sensibilisés avec du sérum de lapin anti-Forssman ou anti-G. R. de chèvre, alors qu'on n'obtient pas de résultats positifs à l'aide du sérum de mononucléose infectieuse ou de l'iso-agglutinine humaine anti-A. On peut aussi obtenir des résultats positifs à l'aide de G. R. de chèvre sensibilisés avec du sérum de lapin anti-chèvre ou anti-mouton; de même, à l'aide de G. R. de bœuf sensibilisés avec un immunosérum de lapin homologue (Pike et Sulkin). Ces auteurs ont obtenu des résultats faiblement positifs à l'aide de G. R. de rat et un immunosérum de lapin homologue, de G. R. de mouton sensibilisés avec du sérum de lapin anti-G. R. de mouton absorbé au préalable à l'aide de rein de cobaye, ou de G. R. de bœuf frais ou bouillis.

Svartz et Schlossmann, en 1949, ont effectué la recherche du facteur activateur sur des sérums dont l'agglutinine anti-mouton avait été préalablement absorbée.

Heller, Jacobson et Kolodny, à la même époque et indépendamment, utilisent pour la même technique, des G. R. conservés dans une solution d'Alsever. L'absorption est réalisée en mettant en contact, pendant quarante minutes à la température du laboratoire et à deux reprises 4 volumes de sérum et 1 volume de culot globulaire, alors que pour Svartz, l'absorption est effectuée en mettant en contact 2 volumes de sérum dilué au 1/2 avec 1 volume de culot globulaire, pendant deux heures à 37° et une nuit à la glacière. Dans les deux cas, la réaction d'agglutination

est lue après une heure à 37° et une nuit à 4°. Heller trouve, sur 39 cas, 90 p. 100 de résultats positifs et Svartz obtient le même pourcentage sur 180 cas.

Ball, en 1950, réalise la même absorption des hétéro-agglutinines, à l'aide de G. R. de mouton normaux en mettant en contact 1 volume de sérum avec 1/2 volume de culot globulaire, pendant une heure à 37°. Le premier, il observe que les G. R. vieux de quatre jours donnent un résultat plus intéressant que les G. R. fraîchement prélevés. La réaction est lue après une heure à 37° et dix-huit heures à 4°, et après trois retournements des tubes de réaction. Il observe 55 p. 100 de réactions positives sur 86 cas, alors que la lecture effectuée après une heure à 37° donne 49 p. 100 de positifs.

Van Loghem-Langereis a comparé les résultats fournis par les deux réactions, avec ou sans absorption des hétéro-agglutinines, et a observé un plus fort pourcentage de résultats positifs après absorption. Il y a au contraire une diminution de la positivité lorsqu'il s'agit de sujets atteints d'affections autres que la polyarthrite chronique évolutive. Le facteur activateur ne peut être mis en évidence qu'en utilisant une concentration d'hémolysine au moins égale au 1/8 de la dose agglutinante. En augmentant la concentration d'hémolysine, on favorise l'action du facteur activateur qui trouve sa valeur la plus élevée en utilisant une dose sensibilisatrice égale à la moitié de la dose agglutinante. Au delà de cette valeur, on risque d'obtenir des résultats faussement positifs. Au cours de chaque réaction, il est nécessaire d'examiner un sérum témoin ayant donné un résultat positif lors d'examens antérieurs, de façon à éliminer les différences obtenues en changeant les lots de G. R. ou d'immunsérums utilisés. L'auteur n'a pas pu mettre en évidence le facteur activateur en utilisant les G. R. humains sensibilisés par un immunsérum de lapin homologue et du sérum de lapin anti-M ou anti-N, ou à l'aide d'iso-immun-agglutinines incomplètes de type anti-Rh₀ (anti-D) ou anti-A, ou encore à l'aide de sérum de lapin anti-G. R. de mouton. Elle n'a pas produit d'hémolysines humaines puissantes par immunisation du lapin.

Wager (1950) a mis en évidence le facteur activateur en utilisant certains systèmes de G. R. et d'antisérums, notamment des G. R. de cobaye ou de poule et un immunsérum de lapin homologue, ainsi que des G. R. de mouton et du sérum de cobaye anti-mouton. Par contre, d'autres systèmes ne peuvent servir à la réaction, il en est ainsi des G. R. de mouton et du sérum de malades atteints de mononucléose infectieuse, des G. R. ORh + et du sérum anti-D, des G. R. du groupe B et d'iso-agglutinines anti-B, ainsi que des G. R. de mouton, de cobaye, de lapin et d'homme sensibilisés avec du sérum normal d'homme et d'ani-

maux. Wager a eu l'idée d'utiliser pour la réaction, les G. R. du malade à examiner et de les sensibiliser à l'aide d'un sérum de lapin anti-humain et il a obtenu par ce moyen des résultats satisfaisants. Il a confirmé que le facteur activateur n'est pas absorbable à 37° par les G. R. normaux d'animaux. Il est absorbable au contraire, à 4°, à l'aide de G. R. de mouton sensibilisés. On peut, après absorption, récupérer l'activateur par élution à 56°.

En 1951, Svartz et Schlossmann ont utilisé la réaction après absorption des agglutinines hétérophiles à l'étude des 309 malades et obtenu 90 p. 100 de résultats positifs dans la polyarthrite. D'après eux cette réaction permet de différencier la polyarthrite des autres syndromes rhumatismaux inflammatoires. En examinant le sérum de lapin normal absorbé au préalable à l'aide de G. R. de mouton, on n'observait pas de titre supérieur à 1/6, alors que les sérums de cobaye et de mouton présentaient des titres de 64 et de 74 respectivement. Les mêmes auteurs ont signalé pouvoir produire ce facteur agglutinant par injection à l'animal d'exsudat articulaire de rhumatisant et par injections répétées de certains diplocoques Gram positifs. Ils observent une réaction négative au cours du syndrome de Reiter-Fiessinger-Leroy.

Des résultats positifs ont été obtenus en utilisant des G. R. humains sensibilisés avec un immunsérum de lapin homologue (Foz et Batalla, 1951), ou en utilisant des G. R. de mouton avec un immunsérum de cheval homologue et des G. R. de souris et de cobaye sensibilisés avec un immunsérum de lapin homologue (Hobson et Gorrill, 1952).

Heller, Jacobson, Kolodny et Schuman ont observé que le sérum normal de certains animaux possédait un facteur activateur analogue à celui mis en évidence chez les rhumatisants et qu'on peut utiliser le sérum de mouton pour obtenir des titres supérieurs, au cours de l'exécution de la réaction. Ils rappellent qu'une action analogue a été attribuée par Bordet et Gay, puis par Bordet et Streng, à un facteur sérique décrit sous le nom de *conglutinine*. Le facteur activateur existant dans le sérum des rhumatisants présente un titre supérieur de quatre fois à celui obtenu après dilution dans de l'eau physiologique, lorsqu'on utilise du sérum de mouton comme liquide de dilution, alors qu'au contraire, le facteur activateur existant dans le sérum normal ne présente pas un titre plus élevé lorsqu'on utilise du sérum de mouton pour la dilution. De tous les sérums d'animaux, le sérum de mouton est celui qui présente le plus d'aptitude à la mise en évidence du facteur activateur, car pour 22 moutons examinés, les titres obtenus ont été augmentés quatre à soixante-quatre fois par dilution des G. R. dans le sérum de l'animal donneur. Ces résultats indiqueraient qu'il y a une différence plus quali-

tative que quantitative entre les facteurs activateurs existant dans le sérum normal et le sérum de rhumatisant.

Etudiant le facteur activateur, Winblad observe qu'il peut être mis en évidence à l'aide de sérum de lapin et aussi de sérum de cobaye anti-mouton. Il est également révélabl à l'aide de G. R. de chevaux et de bœufs sensibilisés par un anticorps homologue. La présence de sérum de lapin dilué inhibe la réaction des G. R. de mouton faiblement sensibilisés. Les sérums de cobaye, de cheval, de bœuf, dans les mêmes conditions ne présentent pas de pouvoir inhibiteur. Le sérum de lapin non dilué ainsi que le sérum d'autres animaux favorise, au contraire, l'agglutination.

Dickgiesser et Harter (1953) ont analysé les différents facteurs

TABLEAU I.

AUTEURS	PUBL.	GLOBULES ROUGES	SÉRUM SENSIBILISANT	NBRE	RÉSULTATS
MEYER	1922	Cobaye, Mouton, Homme Bœuf	Immunsérums homologues "		+ 0
PIKE; SULKIN; COGGESHALL	1949	Mouton " " Bœuf Homme Chèvre " Rat "	Lapin anti-G.R. Chèvre " " Forssman Mononucléose Infec. Homme anti-A Lapin anti-G.R. Bœuf " " " Homme O " " " Chèvre " " " Mouton Chien normal Lapin anti-G.R. Rat	2	+ + et 0 0 0 + 0 + + 0 ±
LOCHEM-LANGEREIS	1950	Homme ABO, Rh+ Homme Homme M et N	Lapin anti-C.R. ABO Isoimmunsérum anti-D anti-A Lapin anti-G.R. M et N		0 0 0 0
WAGER	1950	Cobaye Poule Mouton " Homme Rh+ Homme B Mouton, Cobaye, Lapin Homme O Homme O	Lapin anti-G.R. Cobaye " " " Poule Cobaye " " Mouton Mononucléose Infec. Isoimmunsérum anti-Rh Homme anti-B (Homme et animaux toutes combinaisons Lapin anti-G.R. O		+ + + 0 0 0 0 +
BATALLA	195	Homme O	Lapin anti-G.R. O		0
ROBSON; GORRILL	1952	Mouton Souris Cobaye	Cheval anti-C.R. Mouton Lapin anti -G.R. Souris " " " Cobaye		+ + +
DICKGIESSER; HARTER.	1953	Chien Bœuf Cobaye Homme A, O, Mouton Homme O Lapin Mouton " Cobaye Homme A Homme O Homme A B O Homme O	Lapin anti-G.R. Chien " " " Bœuf " " " Cobaye " " " A Poule " " O " " " Lapin Chien anti-G.R. Mouton Lapin " Forssman " "rein de cheval " "rein de Cobaye Poule anti-G.R. Cobaye Lapin " Forssman " anti-G.R. O Chèvre " " A B O Lapin " " O papainés	2 2 3 6 7 2 1 2 2 2 4 2 8 2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 + et 0 + et 0 + et 0 +

qui interviennent dans la réaction et ont examiné, comme l'indique le tableau, successivement les G. R. de chien, de bœuf, de cobaye sensibilisés à l'aide d'immunsérums homologues de lapin, puis des G. R. humains ou de mouton sensibilisés à l'aide de sérum de lapin anti-G. R. du groupe A ou encore des G. R. humains 0 avec du sérum de poule anti-G. R. du groupe O, ou des G. R. de lapin, ainsi que des G. R. de cobaye avec des sérums de poule homologues, enfin des G. R. de lapin et de mouton avec un immunsérum de chien homologue et des G. R. de mouton et d'homme sensibilisés avec un sérum de lapin anti-Forssman, et des G. R. humains 0 sensibilisés avec un sérum de poule, de lapin, de chèvre homologue. Ils ont obtenu des résultats positifs en sensibilisant respectivement des G. R. humains A avec du sérum de lapin anti-Forssman, des G. R. 0 avec un immunsérum de lapin homologue, des G. R. humains avec des sérums de chèvre homologues et des G. R. 0 avec du sérum de lapin immunisé vis-à-vis de G. R. 0 papainés.

Jacobson, Kammerer, Kolodny et Heller (1953) ont effectué parallèlement la réaction après absorption des hétéro-agglutinines en réalisant la dilution dans de l'eau physiologique et dans du sérum de mouton, et ils ont considéré comme positives les réactions donnant un titre quatre fois plus élevé en utilisant du sérum de mouton.

ETUDE DES DIVERS SYSTÈMES DE GLOBULES ROUGES ET D'IMMUNSÉRUMS.

Nous avons examiné, dans un premier temps, le sérum de 948 malades atteints de rhumatisme inflammatoire chronique dont 509 atteints de polyarthrite évolutive, en évaluant le taux de l'activateur de l'hémagglutination des G. R. de mouton sensibilisés sans absorption préalable des hétéro-agglutinines et obtenu 40 p. 100 de réactions positives, pour ce dernier groupe. Dans un deuxième temps, nous avons effectué la réaction comparativement sur le sérum absorbé et sur le sérum non absorbé. Nous avons, à l'aide du sérum de rhumatisants possédant un taux élevé de facteur activateur, recherché l'aptitude de certains systèmes de G. R. et de sérum homologue à la mise en évidence de ce facteur. Nous avons examiné 23 systèmes et 44 immunsérums et obtenu deux séries de résultats les uns positifs, c'est-à-dire permettant la révélation du facteur activateur, les autres négatifs. Chacun des immunsérums utilisés a été dilué au tiers, au quart ou au cinquième de la dose agglutinante pour sensibiliser les G. R. Les sérums de polyarthrite ont été utilisés après absorption des hétéro-agglutinines correspondantes aux G. R. servant à la réaction et sans absorption.

La technique utilisée consiste à titrer le pouvoir agglutinant du sérum du malade pour des G. R. sensibilisés à une dose non agglutinante. Les G. R. proviennent de sang prélevé à raison de 10 volumes pour 1 volume de citrate de soude à 10 p. 100. Ces G. R. sont frais ou prélevés depuis quatre jours. Ils sont utilisés après trois lavages à l'eau physiologique. Une partie de ces G. R. est utilisée après traitement par une solution de papaine à raison de 0,5 ml de culot globulaire pour 0,5 ml de la solution de papaine obtenue en diluant une ampoule d'enzyme protéolytique de l'Institut Pasteur desséchée à froid dans 1 ml d'eau physiologique. Le traitement des G. R. de rat a été réalisé avec seulement 0,25 ml de la solution et 0,5 ml d'eau physiologique. On met en contact pendant trente minutes à 37°. On pratique ensuite un lavage à l'eau physiologique à 37° et on réalise une suspension de G. R. à 1 p. 100.

Les sérums sensibilisants ont été décomplémentés par chauffage à 56° pendant trente minutes et ensuite dilués du 1/2 au 1/10 000, dans de l'eau physiologique, à raison de 0,5 ml dans chaque tube. Deux séries de dilutions ont été préparées pour chaque sérum.

Les deux séries de dilutions de sérums sensibilisants sont placées au bain-marie à 37°, pendant dix minutes, à raison de 0,5 ml par tube avant d'ajouter dans chaque tube 0,5 ml d'une suspension à 1 p. 100 soit de G. R. normaux, soit de G. R. papainés.

Une première lecture est faite après une heure à 37° et une deuxième après dix-huit heures à la glacière à 4°.

La sensibilisation des G. R. est réalisée après avoir ajouté à une suspension à 1 p. 100 de globules rouges, un volume égal de l'immunsérum dilué au 1/2, au 1/3, au 1/4, au 1/5 de la dose agglutinante. Après agitation, le mélange est placé pendant une heure à 37°. La suspension est alors mise en contact avec la dilution du sérum des malades. Pour chaque malade on a procédé à l'examen de quatre échantillons de sérum dilué de 1/2 à 1/8 000, à raison de 0,2 ml dans chaque tube avec 0,2 ml de la suspension de G. R. à 0,5 p. 100. Ces quatre échantillons comprennent :

Le sérum normal décomplémenté, non absorbé, titré vis-à-vis de G. R. normaux non sensibilisés.

Le sérum normal décomplémenté, non absorbé, titré vis-à-vis de G. R. normaux sensibilisés.

Le sérum décomplémenté absorbé à l'aide de G. R. normaux, titré vis-à-vis de G. R. sensibilisés.

Le sérum décomplémenté, absorbé à l'aide de G. R. normaux de mouton titré vis-à-vis de G. R. du mouton P8, sensibilisés avec du sérum de lapin homologue (anti-mouton P8).

Une première lecture est faite après une heure à 37°, une deuxième est faite après quatorze heures à la glacière.

Ces titrages comparatifs ont été effectués vis-à-vis de globules rouges sensibilisés au 1/3, au 1/4, au 1/5 de la dose agglutinante.

Les systèmes suivants nous ont donné des résultats négatifs :

G. R. de mouton :

- 2 sérums de cheval anti-G.R. de mouton.
- 2 sérums de mouton anti-G.R. de mouton.
- 1 sérum de mouton anti-G.R. de chèvre.
- 5 sérums mononucléose infectieuse.
- 1 sérum d'humain anti-A.

G. R. d'homme :

- 1 sérum d'âne antiglobuline humaine.
- 1 sérum de chevreau anti-G.R. humains.
- 1 sérum de bœuf anti-G.R. humains.
- 1 sérum de cheval anti-G.R. humains.
- 1 sérum de mulet anti-G.R. humains.
- 2 sérums d'humain anti-A.

G. R. de singe :

- 1 sérum de cheval anti-G.R. de singe.

G. R. de chat :

- 2 sérums de chien anti-G.R. de chat.
- 2 sérums de lapin anti-G.R. de chat.

G. R. de cheval :

- 1 iso-immunsérum de cheval.
- 1 sérum de lapin anti-G.R. de cheval.
- 1 sérum de lapin anti-G.R. de mulet.
- 1 sérum de bœuf anti-G.R. de cheval.

G. R. de rat :

- 1 sérum de chien anti-G.R. de rat.

Par contre nous avons observé, comme nous le présentons dans le tableau II, des résultats intéressants permettant la mise en évidence du facteur activateur. De plus, nous avons observé des résultats faiblement positifs en utilisant des G. R. humains du groupe 0 avec quatre sérums de lapin anti-N et un sérum de lapin anti-M. En effet, le sérum de rhumatisant présentant, après absorption des agglutinines hétérologues, un titre de 256 vis-à-vis des G. R. sensibilisés de mouton, avait un titre compris entre 2 et 16, en utilisant ces cinq sérums de lapin anti-humain.

L'examen du tableau II permet de tirer un certain nombre de

TABLEAU II.

G. R.	SÉRUM SENSIBILISANT	TITRE AGGLUTINANT				DOSE SENSIBILISANTE	SÉRUMS P.C.E. (R.A.S.)				
		GR NORMAUX		GR PAPAINES			NON ABSORB.		TAUX ACTI-VAT.	ABSORBES	
		37°	4°	37°	4°		GRNS	GR S		GRS	GRS P8
Mouton P8	LAPIN 292 antiGR P8	80	120	640	1200	1/4	15	320	22	256	256
" "	" 248 " "	40	40	1200	1200	1/4	8	1024	128	512	512
" "	" 238 " "	80	80	2500	2500	1/4	8	256	42	256	256
" "	" 232 " "	320	640	5000	6000	1/4	16	320	20	256	256
" "	MOUT. antiGR MOUT.	20	10	640	320	1/5	-	-	-	256	256
BELIER	CHEV. antiGR BELIER	2	0	320	320	1/4	-	-	-	256	256
CYNOCEPH.	LAPIN " " CYNOC. papainés	320	80	640	320	1/3	8	256	32	128	256
"	" antiGR CYNOC.	80	40	40	80	1/3	8	128	24	64	256
CHAT	" 158 antiGR CH.	640	320	2500	1200	1/4	8	256	24	-	256
"	" 159 " " CHAT	640	320	2500	1200	1/3	8	128	24	-	256
HOMME O	" 171 anti-N	320	320	2500	640	1/3	-	256	-	128	256
" "	" 170 anti-N	160	160	640	320	1/3	-	128	-	64	256
" "	" 175 " "	80	160	1200	640	1/3	-	128	-	96	256
" "	" 776 " -M	160	160	2500	1200	1/4	-	-	-	64	256
" "	" 785 " H/N	320	320	2500	2500	1/4	-	-	-	64	256
" "	CHEVAL antiGR HOMME	640	160	2500	1200	1/4	-	-	-	64	256

conclusions. Les chiffres indiqués dans les différentes colonnes désignent successivement :

1° La nature des G. R. utilisés.

2° La nature du sérum sensibilisant.

3° Le titre du sérum sensibilisant, respectivement à 4° et à 37°, vis-à-vis des G. R. normaux et papainés.

4° La dose de sérum sensibilisant utilisée pour la réaction, et ne provoquant pas l'agglutination des G. R. mis en suspension dans de l'eau physiologique et du sérum normal dilué au 1/60.

5° Le sérum des malades examinés : a) Titre du sérum non absorbé vis-à-vis de G. R. normaux ; titre vis-à-vis de G. R. sensibilisés.

b) Taux de l'activateur, c'est-à-dire rapport des titres agglutinants vis-à-vis de G. R. sensibilisés et non sensibilisés.

c) Titre vis-à-vis de G. R. sensibilisés du sérum dont les hétéro-agglutinines correspondantes aux G. R. normaux ont été absorbées pour l'agglutination.

d) Titre témoin en utilisant les G. R. du mouton P8 sensibilisés par un sérum de lapin homologue.

La dose sensibilisante d'immunsérum utilisée a été respectivement 1/3, 1/4, 1/5 de la dose agglutinante. Dans ce tableau, seuls ont été rapportés les résultats obtenus grâce à des doses ne donnant pas d'agglutination pour les témoins contenant

des G. R. sensibilisés mis en suspension dans de l'eau physiologique et du sérum normal dilué au 1/60, après absorption des hétéro-agglutinines.

Les G. R. qui ont été le plus souvent utilisés sont des G. R. de mouton conservés, alors que la plupart des auteurs au début utilisaient des G. R. fraîchement prélevés. Depuis Heller, on admet qu'on obtient de meilleurs résultats avec des G. R. conservés depuis plusieurs jours.

Nous n'avons pas pu faire encore d'observations analogues en ce qui concerne les G. R. d'autres provenances.

Certains auteurs ont décrit des différences individuelles suivant le mouton donneur. Nous avons observé ces différences individuelles en effectuant l'examen du sérum non absorbé, mais ne les avons pas retrouvées à l'examen du sérum absorbé. Ceci souligne l'intérêt d'utiliser un sérum positif témoin chaque fois qu'on change le lot de G. R. ou d'immunsérum sensibilisant.

En réalité les résultats médiocres obtenus avec le sérum de cheval anti-mouton sont attribuables maintenant au titre élevé de l'hémagglutinine complète existant dans ce sérum. C'est en comparant le titre des agglutinines complètes et incomplètes qu'on peut prévoir l'aptitude d'un immunsérum à être utilisé dans la réaction. Il y a en effet une relation entre le titre de l'agglutinine incomplète vis-à-vis des G. R. papainés et le titre de l'hémolysine, alors qu'il n'y a pas de relation entre le titre des G. R. normaux et le titre de l'hémolysine (Dickgiesser et Harter). Les résultats les plus intéressants ont été obtenus à l'aide de sérums présentant un rapport élevé du titre de l'agglutinine incomplète, par rapport à l'agglutinine complète.

Les sérums les plus intéressants sont les iso-immunsérums de mouton obtenus après immunisation prolongée et ne présentant qu'un faible titre d'agglutinines complètes et un titre élevé d'agglutinines incomplètes. Il en est de même du sérum de chèvre anti-mouton. Comme l'indique le tableau, les résultats obtenus à l'aide de ces sérums sont aussi élevés que ceux obtenus à l'aide du système témoin : G. R. du mouton P8 et sérum de lapin homologue. Un autre système d'un intérêt certain est constitué par l'utilisation de G. R. humains et de sérum de lapin anti-homme. En effet, l'utilisation de G. R. humains du groupe O permettrait d'éviter le temps d'absorption de l'agglutinine hétérologue, mais les immunsérums anti-homme employés jusqu'à maintenant possèdent tous une agglutinine complète de titre élevé, qui diminue d'autant le rapport intéressant. La thermolabilité relative de ces agglutinines complètes permet leur élimination par chauffage, avec persistance des agglutinines incomplètes et de la substance sensibilisatrice, et celle-ci est différente de celles-là.

Les autres sérums anti-homme que nous avons examinés, sérum

de bœuf, de cheval, d'âne, de chèvre, de mouton et de singe, ne nous ont pas fourni de résultats suffisamment intéressants sauf le cas du sérum d'un cheval anti-homme.

La dose d'immunsérum sensibilisante peut être appréciée soit par rapport à l'agglutinine complète, soit par rapport à l'agglutinine incomplète. Cette dose de sensibilisation ne doit pas atteindre 50 p. 100 de la dose agglutinante et doit même rester inférieure à 35 p. 100 de celle-ci. La sensibilisation est d'autant plus puissante que l'agglutinine incomplète ou l'hémolysine a un titre plus élevé. La trop forte sensibilisation pratiquée par certains auteurs peut expliquer les résultats faussement positifs obtenus.

Cependant, le titre du facteur activateur est d'autant plus élevé que la dose sensibilisatrice est plus grande. Ce phénomène qui a été observé par Waaler, puis par Dickgiesser, a été retrouvé pour d'autres systèmes.

Les immunisations prolongées semblent favoriser l'élaboration d'anticorps utiles à la réaction, au moins dans certains cas. Nous avons, comme Winblad, obtenu de meilleurs résultats en utilisant du sérum de lapin immunisé pendant deux à trois mois, à l'aide de G. R. de mouton. Les iso-immunsérums de mouton ou les sérums de chèvre anti-mouton proviennent aussi d'animaux immunisés pendant de nombreux mois.

La température de sensibilisation est le plus souvent de 37°. Cependant, Ball opère à la température du laboratoire.

Les quantités de G. R. utilisées pour la réaction varient suivant les auteurs et sont comptées à partir soit du culot globulaire, soit à partir du sang total. La suspension est soit à 0,50, soit à 0,25 p. 100. La sensibilisatrice se fixe sur les G. R. d'une manière irréversible et permet la centrifugation de ceux-ci et leur lavage en eau physiologique. La réaction est le plus souvent lue après une heure ou deux de séjour à 37° et une nuit à la glacière.

Le facteur activateur ne présente pas de modifications du titre après conservation des sérums à — 10° ou à — 20°. Il résiste aux congélations et décongélations successives, au chauffage trente minutes à 56° et à l'absorption des agglutinines hétérophiles réalisée avec 0,7 cm³ de sérum et 0,5 cm³ de culot globulaire pendant une heure à 37° et dix-huit heures à 4°.

L'absorption des hétéroagglutinines permet, de plus, d'éliminer les substances sensibilisatrices qui peuvent exister normalement chez l'homme et être responsables des résultats faussement positifs.

MÉCANISME DE LA RÉACTION.

Le mécanisme de cette réaction reste mystérieux, malgré les nombreuses expériences effectuées par différents chercheurs. On

a voulu rapprocher cette réaction de celles découvertes par Moreschi (1911) et Coombs (1943).

Moreschi a observé que le sérum de lapin anti-sérum de chèvre était susceptible d'augmenter l'agglutination des G. R. de lapin sensibilisés à l'aide d'un sérum de chèvre anti-G. R. de lapin. Les G. R. de cobaye mis en contact avec du sérum frais de cheval sont agglutinés à l'aide de sérum de lapin anti-sérum de cheval, mais non à l'aide de sérum de lapin normal. On pourrait supposer l'apparition, chez les malades atteints de rhumatisme, d'anticorps anti-globuliniques, dans ce cas d'hétéroglobulines. Celles-ci pourraient être produites par l'immunisation du malade, soit par ses propres protéines modifiées par contact avec des bactéries ou des virus, ou seraient sous la dépendance de ces bactéries ou de ces virus. On peut aussi supposer l'intervention d'une stimulation non spécifique entraînant l'augmentation de l'éventail d'action des protéines et la correspondance fortuite entre la protéine synthétisée et l'antigène.

Contre cette hypothèse, on peut alléguer qu'aucun observateur n'a pu mettre en évidence de réaction de précipitation entre le sérum des malades et l'immunsérum sensibilisant.

Mais ces recherches ont toujours été effectuées à l'aide de la technique de précipitation interfaciale dont la sensibilité est bien inférieure à la sensibilité de la réaction d'hémagglutination passive, par exemple. La sensibilité cutanée des malades aux hétéro-immunsérums utilisée pour la réaction recherchée par Daneo et Einaudi ne s'est révélée positive que dans une faible proportion des cas. On peut concevoir, cependant, une indépendance des deux anticorps.

Il est plus intéressant de remarquer que le facteur activateur n'est pas mis en évidence avec tous les systèmes de G. R. et d'immunsérums, bien que les anticorps incomplets soient présents, comme le sérum anti-Rh, par exemple.

De plus, le facteur activateur n'est pas neutralisé par la globuline de lapin normal (van Loghem-Langereis). Cependant, le sérum de lapin dilué au quart inhibe la réaction. Cette inhibition apparaît limitée au moment où les trois facteurs sont présents et n'est pas attribuable à une modification de la sensibilisatrice des G. R. utilisés ou du sérum du malade (Daneo et Einaudi).

Le fractionnement, à l'aide de la méthode au gaz carbonique, du sérum de rhumatisants, a montré à Svartz et Schlossmann que le facteur hémagglutinant se trouve dans la fraction globulinique.

En étudiant le précipité et le liquide surnageant ainsi que le sérum non fractionné, ils ont observé trois types de réactions : pour les spondylarthrites et polyarthrites en évolution, le facteur se retrouve dans les trois liquides examinés, pour les formes

inactives, il ne se retrouve que dans le précipité. Au contraire, il existe dans le liquide surnageant dans le cas de lupus et de R. A. A. On peut concentrer le facteur activateur après dilution du sérum au 1/15, puis après agitation et quarante-huit heures à 4° on obtient un précipité riche en globulines-gamma. Le titre du facteur ne semble pas être modifié au cours du traitement par la cortisone.

Ziff, Brown, Badin et McEwen, en 1954, ont confirmé que le facteur activateur peut être retrouvé dans la fraction euglobulinique après élimination d'un inhibiteur. En utilisant la fraction euglobulinique pour la réaction, on observe une augmentation du pourcentage des réponses positives, sans faire apparaître une augmentation des résultats non spécifiques. Cette fraction ne présentait pas de pouvoir inhibiteur, alors que 95 p. 100 des sérums témoins sont doués de ce pouvoir. Ce facteur activateur a été retrouvé dans la fraction euglobulinique de 6 sur 12 jeunes malades atteints d'arthrite rhumatoïde, mais dans aucun cas de spondylarthrite de l'adulte ou d'arthrite avec psoriasis.

L'identité du facteur activateur et de la fraction C'4 du complément a été soutenue par Hobson et Gorrill (1952). Ces auteurs ont observé que le facteur activateur n'est pas diminué par chauffage du sérum soixante minutes à 56° et que l'agglutination est même facilitée, par la destruction probable de C'1 qui inhiberait l'activité du facteur.

Pillemer (1942) a déjà observé une action antagoniste, analogue de C'1 à la lyse par C'4. En réalisant l'absorption de C'4 par le « Zymosan », les auteurs n'ont pas noté de modifications de la teneur en activateur dans le sérum de 135 malades présentant une réaction positive. La fraction C'4 serait détruite en même temps que le facteur activateur, par l'ammoniaque.

Les résultats obtenus plus récemment par Daneo et Einaudi (1954) ne sont pas en faveur de l'identité du facteur activateur et du composant C'4. Ces mêmes auteurs n'ont pas observé d'inhibition du facteur activateur par les fractions thermolabiles C'1 et C'2 du complément.

De toutes façons, le facteur sensibilisant existant dans le sérum de lapin anti-mouton ou le facteur activateur ne présentent pas de relation avec l'antigène Forssman ou celui de la mononucléose infectieuse, car l'absorption par des G. R. de bœuf bouillis ou de rein de cobaye ne diminue pas le pouvoir sensibilisant de l'ambocepteur. On ne peut pas déceler d'effet bloquant en ajoutant des G.R. sensibilisés à un sérum contenant le facteur activateur, préalablement mis en contact avec le sérum sensibilisant (van Loghem-Langereis). Le titre du facteur n'est pas diminué après absorption à l'aide des antigènes O et L du streptocoque.

Il n'y a pas non plus de relation entre les antigènes érythrocytaires et le facteur puisqu'il est révélaible par des G. R. sensibilisés pour lesquels le malade ne possède pas d'agglutinine hétérologue. De plus, il n'a jamais été mis en évidence d'iso-hémagglutinines irrégulières à l'examen des sérums possédant le facteur activateur à fortes doses.

L'utilisation des différents systèmes de détection nous a montré que c'est le même facteur qui est révélaible. Les sérums de malades donnant un résultat négatif pour les systèmes de référence (G. R. de mouton et immunsérum de lapin homologue) restent négatifs. Un système ayant donné un résultat positif avec certains sérums positifs donne les mêmes titres relatifs avec les autres sérums positifs.

On peut se demander si le mécanisme de cette réaction n'est pas analogue à celui de l'hémagglutination passive et si le facteur activateur ne serait pas un anticorps correspondant à un composant absorbé par les globules : les résultats de Heller (1954) sont en faveur de cette hypothèse car la réaction d'agglutination peut être réalisée suivant la technique de Boyden, à l'aide de G. R. tannés ayant adsorbé de la fraction II (de E. Cohn) de globuline humaine. Cette fraction sérique contient un inhibiteur de la réaction d'agglutination mis en évidence lorsqu'on utilise du sérum humain comme liquide de dilution des globules sensibilisés.

RÉSUMÉ.

Bien que son mécanisme en soit mal élucidé, la réaction d'agglutination des G. R. sensibilisés par un immunsérum s'est révélée d'un intérêt diagnostique certain.

Si l'une des meilleures techniques repose sur l'utilisation de G. R. de mouton et de sérum de lapin anti-mouton, il est aussi possible de mettre en évidence le facteur activateur responsable de la réaction, en utilisant les différents systèmes suivants :

Les G. R. de mouton et certains iso-immunsérums de mouton ou de chèvre anti-mouton ;

Les G. R. de cynocéphale et les G. R. de chat et un immunsérum de lapin homologue ;

Les G. R. humains et un immunsérum de lapin anti-N et anti-M et un immunsérum de cheval anti-homme.

L'aptitude d'un immunsérum à révéler le facteur activateur dépend essentiellement d'un rapport des titres de l'hémagglutinine complète et de l'hémagglutinine incomplète, décelable à l'aide de G. R. traités par un enzyme protéolytique.

La réaction doit être exécutée à l'aide de sérum dont les hétéro-hémagglutinines ont été préalablement absorbées.

BIBLIOGRAPHIE

- J. BALL. *Lancet*, 1950, **2**, 520.
- J. BORDET et F. P. GAY. *Ces Annales*, 1906, **20**, 467.
- J. BORDET et O. STRENG. *Centralbl. Bakt.*, 1909, **49**, 47.
- J. BORDET et O. GENGOU. *Centralbl. Bakt.*, 1911, **58**, 330.
- R. R. COOMBS, A. E. MOURANT et R. R. RACE. *Brit. J. exp. Path.*, 1945, **26**, 255.
- V. DANE0 et G. EINAUDI. *Minerva Medica*, 1954, **45**, 714.
- V. DANE0 et G. EINAUDI. *Reumatismo*, 1954, **4**, 252.
- V. DANE0 et G. EINAUDI. *Reumatismo*, 1954, **5**, 1.
- H. R. DEAN. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 1911, **84**, séries B, 416.
- F. DICKGIESSER et F. HARTER. *Z. ges. exp. Med.*, 1953, **122**, 221.
- F. HARTER et F. DICKGIESSER. *Deutsch. Archiv klin. Med.*, 1953, **200**, 202.
- G. HELLER, A. S. JACOBSON et M. H. KOLODNY. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 316.
- G. HELLER, A. S. JACOBSON, M. H. KOLODNY et R. L. SCHUMAN. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 27.
- R. H. GORRIL et D. HOBSON. *Lancet*, 1952, **1**, 424 et 389.
- A. JACOBSON, W. H. KAMMERER, M. H. KOLODNY et G. HELLER. *VIII^e Congrès Intern. Malad. Rhumat.*, Genève, 1953, Communications.
- F. JACQUELINE, A. EYQUEM et P. REBEYROTTE. *Rev. Rhumat.*, 1952, **19**, 928.
- F. JACQUELINE, A. EYQUEM et E. JOCHEM. *Rev. Rhumat.*, 1953, **20**, 617.
- E. JAWETZ et E. V. HOOK. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **70**, 650.
- P. E. VAN LOGHEM-LANGEREIS. *Thèse*, 1950, Amsterdam.
- K. MEYER. *Z. Immunitätsf.*, 1922, **34**, 229.
- C. MORESCHI. *Zbl. Bakt.*, 1908, **46**, 49.
- C. MORESCHI. *Z. Immunitätsf.*, 1911, 275.
- O. OLSEN. *Z. Immunitätsf.*, 1922, **33**, 283.
- L. PILLEMER. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 421.
- R. M. PIKE, S. E. SULKIN et H. C. COGGESHALL. *J. Immunol.*, 1949, **63**, 441.
- R. M. PIKE, S. E. SULKIN et H. C. COGGESHALL. *J. Immunol.*, 1949, **63**, 447.
- R. M. PIKE, S. E. SULKIN et H. C. COGGESHALL. *J. Immunol.*, 1951, **66**, 107.
- R. M. PIKE, S. E. SULKIN, H. C. COGGESHALL et R. T. BURDETTE. *J. Lab Clin. Med.*, 1953, **41**, 880.
- H. M. ROSE, C. RAGAN, E. PEARCE et M. O. LIPMAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1948, **68**.
- N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Nord. Med. Tskr.*, 1949, **42**, 1390.
- N. SVARTZ. *Acta Med. Scand.* (Suppl.), 1950, **246**, 240.
- N. SVARTZ. *II^e Cong. Europeo de Reumatol.*, 1951, 24-27 septembre. Edit. Sci., Barcelona.
- N. SVARTZ. *Nord. Med. Tskr.*, 1951, **32**, 1199.
- N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Acta Med. Scand.*, 1952, **142**, n° 6, 420.
- N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Schweiz. med. Wsch.*, 1953, **83**, 771.
- N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Acta Med. Scand.*, 1953, **146**, n° 4, 313.

- N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Acta Med. Scand.*, 1953, **145**, n° 3, 216.
 N. SVARTZ. *VIII^e Cong. Intern. Malad. Rhumat.* Genève, 1953, Communications.
 N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Nord. Med. Tskr.*, 1953, **49**, 3.
 N. SVARTZ et K. SCHLOSSMANN. *Acta Med. Scand.*, 1954, **149**, 83.
 E. WAALER. *Third Intern. Cong. Microbiol. Abstracts of communications* 1939.
 E. WAALER. *Acta Path. Scand.*, 1940, **17**, 172.
 O. WAGER. *Amer. Med. Exp. Biol. Fenniae*, 1950, **28** (suppl. 8).
 O. WAGER et E. ALAMERI. *Amer. Med. Exp. Biol. Fenniae*, 1953, **31**, 361.
 S. WINBLAD. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1950, suppl. 91, 115.
 S. WINBLAD. *Acta Med. Scand.*, 1952, **142**, 450.
 S. WINBLAD. *Acta Med. Scand.*, 1952, **142**, 458.
 M. ZIFF, P. BROWN, J. BADIN et C. McEWEN. *Bull. Rhumat. Dis.*, 1954, **5**, 75.

ÉTUDE DE LA BIOCHIMIE DE LA SPORULATION CHEZ *BACILLUS MEGATERIUM*.

III. — ÉTUDE DU COMPORTEMENT D'UNE SOUCHE DE *B. MEGATERIUM* ASPOROGÈNE MISE DANS LES CONDITIONS DE SPORULATION

par REGINA TINELLI (*).

(Institut Pasteur, Service des Fermentations
[professeur LEMOIGNE].)

Nous avons montré précédemment [5, 6] que, lors d'une sporulation par carence de glucose, *B. megaterium* subit les transformations suivantes :

- Diminution du poids de la matière sèche (65 p. 100 environ) ;
- Disparition totale du lipide β -hydroxybutyrique ;
- Disparition partielle des polyosides, 75 p. 100 environ ;
- Apparition d'acide uronique et de dipicolinate de Ca ;
- Augmentation des échanges respiratoires.

Nous nous sommes demandé si ces modifications et la formation des spores sont non seulement simultanées, mais encore liées intimement entre elles pour ne constituer, en fait, qu'un seul phénomène.

Pour cela nous avons comparé ces modifications obtenues avec la souche sporogène à celles observées dans les mêmes conditions avec une souche asporogène du même bacille.

Obtention des souches asporogènes.

Les expériences que nous allons décrire ont été réalisées à l'aide de deux souches différentes que nous désignerons par souche A et souche B.

La souche A a été obtenue par Grelet après culture de la souche M. L. A. sur milieu sans magnésium [2].

La souche B a été obtenue après 15 à 20 repiquages de la souche habituelle sur milieu au butane-diol. A ce moment les bacilles obtenus ne contenaient plus ni lipide ni polyosides,

(*) Manuscrit reçu le 10 janvier 1954.

mais 13 p. 100 d'azote (ce qui est en accord avec les résultats d'Aubert, 1950 [4]).

Au fur et à mesure des repiquages, la sporulation se fait de plus en plus difficilement. Les bacilles obtenus après 20 repiquages n'ont pas sporulé après huit jours de culture, alors que le pH était convenable et que le butane-diol était disparu. Pensant que peut-être des produits du métabolisme présents dans le milieu gênaient la sporulation, nous avons repris la technique habituelle de remise en suspension des bacilles dans un milieu purement minéral [5]. Mais là encore après trois jours, aucune spore ne s'était formée.

Nous avons alors constaté que ces bacilles ne contenant pour ainsi dire que des protéines, poussent très bien sur milieu minéral glucosé : ils reprennent à peu près leur composition primitive en lipide, polyosides et protéines, mais ils demeurent asporogènes lorsque le glucose est épuisé. Cette propriété persiste également lors d'un deuxième passage sur glucose.

La souche initiale sporogène était donc devenue asporogène vis-à-vis d'une carence de glucose tout en gardant une composition apparente identique.

Résultats.

I. — RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA SOUCHE A.

A. Composition des bacilles :

Polyoside	9 p. 100
Lipide	30 p. 100
N Kjeldahl	7 p. 100

Cette composition est voisine de celle des bacilles sporogènes cultivés sur glucose. La teneur en polyoside est légèrement inférieure : ce polyoside est totalement hydrolysé en deux heures dans de l'acide sulfurique N/1, ce qui laisse supposer qu'il est moins polymérisé. La méthode chromatographique a montré l'existence des mêmes constituants que ceux du polyoside des bactéries sporogènes : glucose et galactose.

B. *Bacilles remis en suspension dans un milieu minéral sans glucose.* — Les bacilles sont récoltés vingt-quatre heures après leur remise en suspension. Ils ont à peu près leur aspect habituel, mais paraissent moins granuleux : aucune spore ne s'est formée.

1 620 mg de bacilles (en poids sec) ont été remis en suspension. Après vingt-quatre heures, nous en avons retrouvé 1 155 mg.

La perte de matière sèche est beaucoup plus faible que chez les asporogènes, 28 p. 100 contre 60 p. 100, et les réserves ne disparaissent pas totalement.

TABLEAU I.

MATIÈRE SÈCHE	DÉPART		FIN		DIFFÉRENCES (en mg)
	1 620 mg		1 155 mg		
	mg	p. 100	mg	p. 100	
Lipide β -hydroxybutyrique.	421	26	144	12,5	— 277
Polyoside	146	9,5	74	6,4	— 72
N Kjeldahl	128	7,9	120	10,4	— 8

C. *Mesure des échanges gazeux en fin d'expérience.* — Par analyse de gaz [6].

Matière sèche :

Départ. 164 mg

Fin 114 mg, perte 50 mg soit 30 p. 100

O₂ air consommé :

$$14,3 \text{ ml ou } 20,45 \text{ mg } \frac{\text{O}_2 \text{ air}}{\text{MS disparue}} = 40,9$$

CO₂ dégagé :

$$24,6 \text{ ml soit } 48,25 \text{ mg } \frac{\text{CO}_2}{\text{MS disparue}} = 96,5.$$

Rappelons que les résultats obtenus avec une souche sporogène [6] sont :

$$\frac{\text{O}_2 \text{ air}}{\text{MS disparue}} = 130$$

$$\frac{\text{CO}_2}{\text{MS disparue}} = 170$$

done beaucoup plus forts.

Les réserves qui ont disparu ne seraient donc pas totalement métabolisées. Nous avons vérifié cette hypothèse avec la souche B.

II. — RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA SOUCHE B.

A. *Composition des bacilles avant et après leur remise en suspension dans un milieu sans glucose.* — Les bacilles sont cultivés sur le milieu minéral habituel additionné de 2 p. 100 de glucose. Après lavages et centrifugations, ils sont remis en suspension dans un milieu sans glucose : malgré cette carence, on n'observe aucune sporulation après deux jours.

TABLEAU II. — (Expérience I.)

MATIÈRE SÈCHE	DÉPART		APRÈS 20 HEURES		DIFFÉRENCES (en mg)
	200 mg		175 mg		— 25
	mg	p. 100	mg	p. 100	
Lipide.	52	26	—	—	—
Polyoside	24	12	14	8	— 10
Azote	13	6,5	11,7	6,7	— 1,3

La perte de matière sèche est extrêmement faible (13 p. 100).

TABLEAU III. — (Expérience II.)

MATIÈRE SÈCHE	DÉPART		APRÈS 36 HEURES		DIFFÉRENCES (en mg)
	576 mg		420 mg		— 156
	mg	p. 100	mg	p. 100	
Lipide.	127	23	27	6	— 100
Polyoside	69	12	42	10	— 27
N Kjeldahl	273	7,6	275	10,5	—

Ici, l'expérience a duré plus longtemps : la perte de matière sèche est plus élevée (27 p. 100), mais toutefois elle reste inférieure à la perte de MS pendant la sporulation (60 p. 100). Le pH s'est abaissé par suite de la formation d'acides.

Nous avons recherché si ces bacilles asporogènes contiennent du dipicolinate de calcium et l'acide uronique. Ces bacilles, ni au début (courbe I), ni vingt heures après leur remise en suspension dans un milieu sans glucose (courbe II) ne contiennent des quantités décelables de dipicolinate (fig. 1). Ces courbes, analogues à celle obtenue dans le cas de bacilles sporogènes avant sporulation, ne présentent pas les trois maximums (2625, 2700, 2775 Å) caractéristiques du dipicolinate de calcium [5].

Les résultats ont été également négatifs en ce qui concerne la présence d'acide uronique. La chromatographie sur papier n'a permis de mettre en évidence que les deux taches : glucose et galactose.

B. Etude cinétique des échanges gazeux. — Nous avons utilisé uniquement la méthode de Warburg. Chaque fiole contient :

0,5 ml de suspension de bacilles (5 mg),

1,4 ml de milieu avec ou sans glucose à pH 6,

0,1 ml de KOH au 1/2.

Cette préparation est faite à basse température. L'expérience est faite à 29° dans l'air.

Les résultats sont résumés par les courbes de la figure 2.

1° Sur milieu complet, les bacilles respirent normalement ; une légère croissance se produit.

2° En absence de glucose, la consommation d'oxygène est à

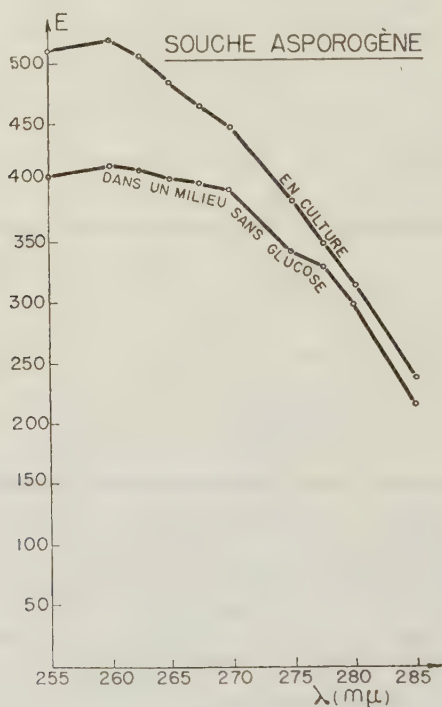


FIG. 1.

peu près constante. La courbe est une droite presque parfaite. La courbe dérivée est une horizontale, alors que dans le cas de la souche sporogène, la courbe présente un maximum très net [5] (fig. 3).

Donc la consommation d'oxygène est beaucoup plus faible lorsqu'il n'y a pas de sporulation, bien qu'il y ait une notable disparition des réserves. On est ainsi amené à supposer que les réserves disparues ne sont pas métabolisées jusqu'au stade $\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}$.

On doit donc retrouver dans le milieu des produits de dégradation des constituants du bacille.

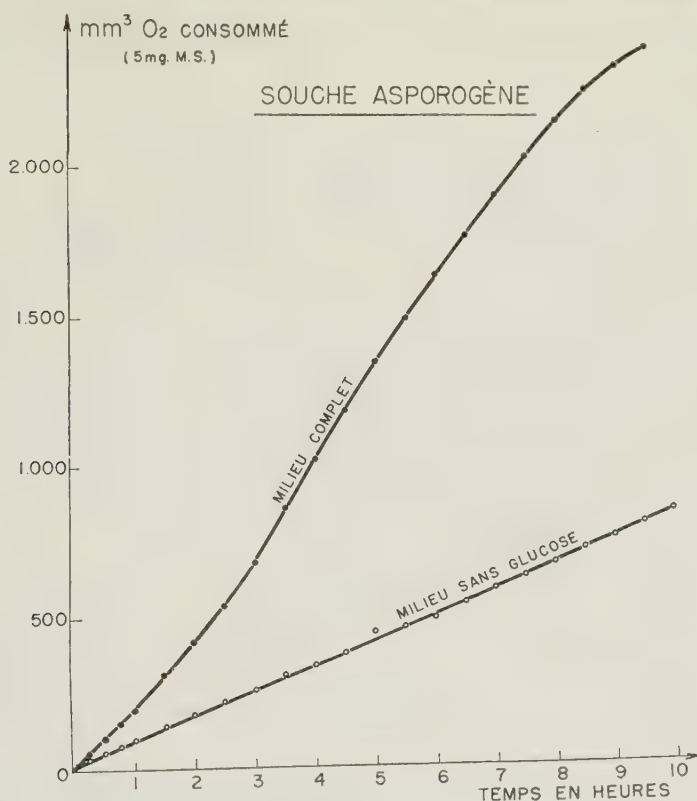


FIG. 2.

C. Analyse des bacilles et du milieu après quarante heures de remise en suspension. — a) Résultats de l'analyse des bacilles au début et en fin d'expérience (tableau IV).

TABLEAU IV.

	DÉBUT		APRÈS 48 HEURES		DIFFÉRENCES (en mg)
BACILLES	1 220 mg		740 mg		perte 480 mg (39 p. 100)
	mg	p. 100	mg	p. 100	
Polyoside	158,6	13	59,2	8	— 99,4
Lipide	317	26	70,3	9,5	— 246,7
N Kjeldahl	90,28	7,4	48	10	
Protéines	564 mg		466 mg		— 103

β) L'analyse du milieu a donné les résultats suivants (le dosage du nitrate n'a pas été fait) [le pH s'est abaissé de 6,1 à 5,9] :

Azote Kjeldahl	4,8 mg
Azote ammoniacal	57,7 mg
Lipide β-hydroxybutyrique	11,7 mg
Polyoside	traces
Substances réductrices (avant défécation) .	146 mg
Substances réductrices (après défécation) .	110 mg
Acides volatils	20,2 mg exprimés en acide acétique

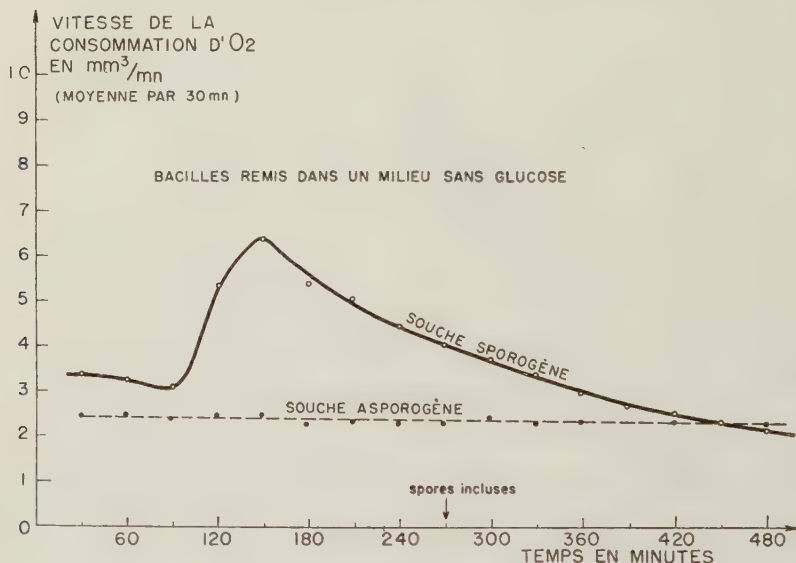


FIG. 3.

(La courbe de Duclaux montre que pratiquement il n'y a que cet acide formé).

Acides fixes : nous n'avons pu mettre en évidence que des traces d'acide β-hydroxybutyrique.

Lemoigne, 1927 [3], avait trouvé que les bacilles sporogènes en l'absence d'air produisent de l'acide β-hydroxybutyrique aux dépens de son polymère, le lipide β-hydroxybutyrique. Dans nos expériences, les conditions sont différentes, en particulier la quantité de bacilles traités et l'aération, ce qui peut expliquer cette différence.

Bien que ne permettant pas de faire un bilan complet, nos résultats montrent qu'il y a lyse des bacilles, car il y a une perte progressive de matière sèche avec le temps, et l'on retrouve, dans

le milieu, une partie des réserves du bacille ou des produits de leur dégradation.

CONCLUSION.

Les bacilles asporogènes placés dans les conditions où, normalement, la sporulation devrait s'effectuer, subissent une autolyse ; les échanges gazeux restent très faibles. L'hypothèse que nous formulons se trouve donc confirmée : dans le cas de la souche sporogène, la disparition du lipide, la diminution considérable des polysides, la formation du dipicolinate de calcium, celle d'acide uronique, qui se traduisent par une augmentation des échanges gazeux, sont liées intimement au mécanisme de la sporogénèse. Ces phénomènes ne résultent pas d'une simple lyse comme dans le cas de bacilles asporogènes, provenant de la même souche, et ayant initialement la même composition chimique.

Les deux phénomènes de lyse sont donc fondamentalement différents. Dans le cas de la sporulation, la lyse est plus active : elle suit un cycle particulier et aboutit à la métabolisation complète de la presque totalité de la matière microbienne qui disparaît. Dans l'autre cas, la lyse est plus lente : son déroulement ne présente aucun point particulier. De plus, elle est incomplète, une partie des réserves disparues se retrouvant, plus ou moins dégradées, dans le milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-P. AUBERT. *Thèse de Doctorat ès sciences*, Paris, 1950.
- [2] N. GRELET. *Ces Annales*, 1952, **82**, 66.
- [3] M. LEMOIGNE. *Ces Annales*, 1927, **41**, 148.
- [4] R. TINELLI. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1622.
- [5] R. TINELLI. *Ces Annales*, 1955, **88**, 212.
- [6] R. TINELLI. *Ces Annales*, 1955, **88**, 364.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 3 Mars 1955.

Présidence de M. PRÉVOT.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Girard. — J'ai l'honneur de présenter à la Société le livre de R. Pollitzer, *La Peste* (1).

Les 10 *Studies on Plague* parues dans les *Bulletins de l'O. M. S.* de novembre 1951 à septembre 1953 sous la signature de R. Pollitzer constituent la substance de cet ouvrage. Ces mémoires, révisés et complétés par les données les plus récentes, forment un traité magistral de la Peste dont aucun des aspects n'a été négligé. L'auteur avait déjà, en 1936, contribué à la rédaction du seul livre que nous possédions sur la Peste, en langue anglaise, écrit en collaboration avec Wu-Lien Teh, J. W. H. Chun et C. Y. Wu. Mais ce « Manual » traitait surtout de la peste en Chine. Resté seul de l'équipe ancienne, Pollitzer a estimé devoir procéder à une refonte complète de l'ouvrage en raison des progrès considérables réalisés depuis vingt ans en épidémiologie, thérapeutique et prophylaxie de l'infection pesteuse. Il convient de l'en féliciter. Nous avons analysé pour le *Bulletin de l'Institut Pasteur* les études de Pollitzer au fur et à mesure de leur parution. Aussi ne rappellerons-nous ici que le titre des chapitres : 1^o Histoire et répartition actuelle de la peste ; 2^o Bacille de la peste ; 3^o Immunologie ; 4^o Anatomie pathologique ; 5^o Diagnostics de laboratoire ; 6^o Hôtes de l'infection ; 7^o Insectes vecteurs ; 8^o Aspects cliniques (avec la thérapeutique) ; 9^o Epidémiologie ; 10^o Lutte et prévention. En annexes : a) la liste des réservoirs et des vecteurs qui comporte 20 pages de tableaux ; b) un chapitre entièrement rédigé par F. G. Smit, le pulicologue du British Museum, conservateur de la collection Rothschild (Siphonaptères), qui a illustré son texte de 40 dessins originaux des plus démonstratifs et permet la détermination des puces. Quant aux autres figures, elles sont pour la plupart inédites et judicieusement

(1) R. Pollitzer. *La Peste*, 1 vol. 737 p., 79 illustrations dont 40 dessins originaux, 2 cart. h.-t. et pl. en couleurs. Traduit par G. Girard. Organisation mondiale de la Santé, série de monographies, n^o 22 (1954). Prix : broché, 3 000 fr. ; relié, 3 300 fr. Dépositaire, Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

choisies. Les références bibliographiques s'élèvent globalement à 2 085 et s'inscrivent à la fin de chacun des 10 chapitres.

Cet ouvrage est parfaitement édité. Il fait honneur à son auteur qui a su dégager de l'abondante documentation mise à sa disposition les notions capitales qui dominent actuellement le problème de la peste dans le monde. Les opinions de l'auteur sont émises avec beaucoup d'objectivité sur les questions qui font présentement l'objet de discussions et gardent la prudence qui s'impose à un auteur impartial, et au surplus très averti comme l'est Pollitzer. Si la peste est une maladie en voie de régression, elle est loin d'être une maladie éteinte et, dans bien des territoires, elle demeure un important problème de santé publique. A ce titre, ce livre représente un guide pratique pour le clinicien, l'hygiéniste et l'épidémiologiste, et pour le loimologue la charte à laquelle il ne cessera d'avoir recours. La version originale *Plague* de cette monographie a paru voici plusieurs mois, en anglais. Il est heureux que l'auteur et la Direction de l'O. M. S. aient décidé d'en avoir une traduction française. Celle-ci a été assurée par nos soins et c'est elle qui est présentée aujourd'hui. Elle aura pour effet d'étendre largement le cadre des lecteurs de l'ouvrage.

COMMUNICATIONS

MODALITÉS DE TRANSFORMATION EN FORMES L IN VIVO DE *PROTEUS VULGARIS* ET D'AUTRES *ENTEROBACTERIACEAE* SOUS L'ACTION DE LA PÉNICILLINE

par E. GRASSET et V. BONIFAS.

(Institut d'Hygiène et Institut de Physique, Université de Genève.)

Nous avons entrepris les travaux exposés dans cette note dans le but d'étudier les transformations présentées par divers microorganismes, tels que *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sous l'action de la pénicilline *in vivo*, et en particulier de mettre en évidence les diverses phases de transformation des formes végétatives de ces microorganismes en des formes L, dans l'organisme animal infecté soumis à l'action antibiotique.

I. *Proteus vulgaris*. — Nos études ont porté sur 10 souches de ce microorganisme, dont les transformations en formes L sous l'action de la pénicilline *in vitro* ont fait l'objet de travaux de divers auteurs, en particulier de Dienes [1, 2] et Tulasne [3, 4, 5].

TECHNIQUE. — Dans une première série d'expériences des souris blanches de 20 à 25 g sont injectées par voie péritonéale avec 0,5 ml

d'une suspension contenant 10^9 bactéries/cm³ d'une culture de 6 heures à 37° de *Proteus vulgaris* souche 4, en bouillon Tryptone Difco. Quelques minutes plus tard, ces animaux reçoivent une injection sous-cutanée de doses variables de pénicilline, de 10 U à 600 U par gramme de souris. Ces animaux sont sacrifiés après des laps de temps de 3 heures, 6 heures à 24 heures, de même que des souris-témoins, injectées avec la même dose de *Proteus vulgaris* en l'absence de traitement pénicillinique. Le liquide péritonéal de ces animaux, aspiré à la



FIG. 1. — Exsudat péritonéal de souris sacrifiées quatre heures après l'injection péritonéale de *Proteus vulgaris* et l'administration sous-cutanée de 6 000 U de pénicilline (Gross. 1 575 \times).

pipette, est aussitôt examiné à l'état frais entre lame et lamelle, au microscope à contraste de phase.

Chez les animaux sacrifiés après 3 heures, ayant reçu des doses de 20 à 30 U par gramme de souris, on remarque un allongement des éléments bacillaires en formes filamenteuses, de même que l'apparition d'un, ou plus rarement de plusieurs renflements sphériques ou ovoïdes sur l'axe bacillaire, aboutissant à la formation de corps globuleux, faisant hernie ou se développant latéralement sur l'axe bacillaire.

Avec des concentrations de 30 à 50 U par gramme de souris, les modifications sont plus importantes : corps globuleux plus volumineux, souvent uniques, réfringents, occupant la partie centrale de l'élément bacillaire dont les deux segments latéraux sont plus ou moins déformés en forme de V, comme il est fréquemment observé lors de transfor-

mations similaires de *Proteus vulgaris* sous l'action de la pénicilline *in vitro*.

Certains de ces éléments libérés du corps bacillaire apparaissent comme des corps globuleux libres, de taille variable, plus ou moins réfringents ou estompés, et dont les plus petits semblent avoir conservé une mobilité propre.

L'injection de doses de 200 à 300 U de pénicilline par gramme de souris a pour résultat des transformations encore plus profondes et plus rapides. La majorité des éléments sont constitués par des formes allongées volumineuses, gonflées ou boudinées, formes géantes atteignant de quatre à cinq fois la taille des éléments bacillaires originaux.

Pour les souris injectées avec la concentration maxima de 600 U de pénicilline par gramme, l'exsudat prélevé après 3 heures ne présente que de rares corps globuleux libres, plus ou moins estompés, de taille variable, les plus volumineux dépassant la taille des globules rouges.

En poursuivant les examens au cours des 6 heures suivantes, on constate que nombre de ces corps globuleux, surtout ceux de grande taille, s'éclaircissent pour devenir transparents. Ces éléments apparemment lysés ne sont plus décelables que par leur contour circulaire réfringent. D'autres continuent à montrer une ou deux zones polaires plus foncées ou plus réfringentes.

Les examens des souris sacrifiées 24 heures après l'injection montrent, pour les animaux n'ayant reçu que de petites doses de 20 à 30 U de pénicilline, des formes de réversion aux formes bacillaires typiques et dont la prolifération entraîne une péritonite mortelle des animaux ainsi traités.

Par contraste, pour les souris injectées avec des doses plus considérables de pénicilline, on assiste à une persistance d'un nombre plus ou moins grand des corps globuleux qui constituent à ce stade les seuls éléments visibles et qui sont susceptibles de redonner naissance à des formes bacillaires dans les jours suivants. L'injection de nouvelles doses de pénicilline (sol. aqueuse ou pénicilline-procaïne) empêche ce phénomène de réversion et vient compléter le processus de lyse des corps globuleux, aboutissant à la survie de l'animal ainsi traité. Des ensemencements sur milieux nutritifs gélose simple des exsudats péritonéaux de souris, montrant des corps globuleux et autres stades de transformation en formes L exposés ci-dessus, provoquèrent dans tous les cas le développement de colonies de type bacillaire, constituées d'éléments bacillaires de *Proteus vulgaris*. Par ailleurs, des ensemencements des mêmes exsudats sur gélose additionnée de concentrations croissantes de pénicilline ont été suivis de l'apparition plus tardive de petites colonies de type L, ceci à partir de concentrations de pénicilline de 50 p. 100 inférieures à celles nécessitées pour obtenir la transformation directe de colonies bacillaires en colonies L sur ce même milieu.

Pour une deuxième série de souris, nous avons adopté la même procédure avec la différence que la pénicilline a été injectée de 2 à 6 heures après l'injection intrapéritonéale de *Proteus vulgaris*. Un premier groupe de souris ayant reçu de 30 U à 300 U de pénicilline par gramme de souris est sacrifié 2 h. 1/2 plus tard. Le liquide péritonéal montre, à côté de formes bacillaires allongées, des formes

filamenteuses et de rares corps globuleux de tailles petite et moyenne. Pour les souris traitées avec 60 U de pénicilline, on observe, en plus



FIG. 2. — Exsudat péritonéal de souris sacrifiées quatre heures après l'injection péritonéale de *Proteus vulgaris* et l'administration sous-cutanée de 6 000 U de pénicilline (Gross. 3 300 \times).

des formes bacillaires et filamenteuses, la présence de corps globuleux à l'état libre dans l'exsudat.

Chez d'autres souris, le traitement pénicillinique n'a été institué que 5 heures après l'injection intrapéritonéale de *Proteus vulgaris*. A ce moment, l'une des souris ainsi infectée, mourante, montre un exsudat péritonéal contenant un grand nombre de *Proteus vulgaris* mobiles. A une deuxième souris infectée de la même façon, présentant un état toxi-infectieux très grave, on administre une injection sous-cutanée de 300 U de pénicilline par gramme de poids du corps, soit au total 6 000 U de pénicilline. Elle meurt 3 heures plus tard, soit 8 heures après l'infection bacillaire. L'autopsie révèle une congestion intense des organes ainsi que des parois de la cavité péritonéale. L'exsudat péritonéal hémorragique montre en plus d'un petit pourcentage de formes bacillaires et filamenteuses boudinées, une majorité d'éléments correspondant à divers stades des transformations décrites ci-dessus, aboutissant à la formation de corps globuleux, soit en voie de développement sur les éléments bacillaires, soit à l'état libre. Nombre de ces corps globuleux, de taille variable, présentent des phénomènes de lyse à divers degrés. Ainsi, malgré l'état toxi-infectieux très avancé de l'animal, la pénicilline injectée par voie sous-cutanée est encore à même d'exercer, bien qu'avec un certain retard, des transformations profondes sur *Proteus vulgaris* en pleine multiplication dans la cavité péritonéale ; ces transformations se révèlent semblables à celles observées lorsque l'antibiotique est administré soit simultanément, soit antérieurement à l'injection du microorganisme.

La répétition de ces diverses expériences avec 10 souches de *Proteus vulgaris* nous a permis d'observer des transformations de même nature. Pour certaines souches, la formation de corps globuleux se produit initialement sur le corps bacillaire sans être précédée d'une phase d'allongement filamenteux, de formes géantes ou boudinées, à partir desquelles se forment secondairement des corps globuleux.

Ces corps globuleux sont susceptibles de survivre dans l'exsudat péritonéal et de donner naissance par ensemencement sur milieu pénicilliné (60 à 100 U/cm³ pour la souche P 4) à des colonies de type L, constituées de corps globuleux ; par ensemencement sur milieu nutritif sans pénicilline, ces corps globuleux redonnent des colonies de type bacillaire typique. Ces mêmes corps globuleux libres sont susceptibles, sous l'influence de concentrations pénicilliniques plus élevées, de subir *in vivo*, comme *in vitro*, des phénomènes de lyse.

Des expériences comparées *in vivo* et *in vitro* avec *Proteus vulgaris*, dans le but de déterminer les doses minima de pénicilline par unité de poids (grammes de souris) susceptibles de déterminer la transformation de formes bacillaires de ce microorganisme en corps globuleux, mettent en évidence, de part et d'autre, des doses-limites assez rapprochées, mais susceptibles de varier sensiblement selon les souches étudiées.

II. Des études réalisées selon des modalités semblables chez la souris, avec d'autres microorganismes tels que *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, nous ont permis de constater sous l'action de la pénicilline, des transformations *in vivo* des éléments bacillaires de plusieurs souches de ces microorganismes en corps globuleux, susceptibles ou non de réversion à la forme bacillaire selon les concentrations de pénicilline utilisées.

RÉSUMÉ.

Les conditions d'expérimentation réalisées chez la souris permettent de mettre en évidence la transformation de formes bacillaires en formes L, filamenteuses, et de corps globuleux *in vivo* pour divers microorganismes tels que *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. Elles permettent d'étudier avec aisance les modalités d'action *in vivo* de la pénicilline sur divers germes sensibles à cet antibiotique, de déterminer en fonction d'unité de poids (gramme) les concentrations d'antibiotique efficaces pour réaliser *in vivo* la transformation des formes végétatives en formes L et corps globuleux. Il en est de même pour les phénomènes de réversion des corps globuleux en formes végétatives aboutissant à une nouvelle phase de multiplication des éléments bacillaires dans l'organisme infecté. Les modalités biologiques des expériences ainsi réalisées *in vivo* se rapprochent beaucoup plus des conditions se présentant en clinique, par le fait qu'elles tiennent compte de la participation active des défenses mises en œuvre par l'organisme infecté contre l'invasion par des microorganismes pathogènes, dont le métabolisme *in vivo* est souvent sensiblement différent de celui qui intervient *in vitro*.

Nous tenons à remercier M^{lle} T. Bonne pour sa précieuse assistance technique dans ce travail.

(Travail effectué grâce à une subvention de la Fondation Fritz Hoffmann-La Roche pour l'expansion en Suisse du travail scientifique exécuté par équipes.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. DIENES. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1946, **63**, 265.
- [2] L. DIENES. *Ibid.*, 1946, **66**, 97.
- [3] R. TULASNE. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1200.
- [4] R. TULASNE. *Ibid.*, 1951, **145**, 429.
- [5] R. TULASNE. *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 223.

**ACTION DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES
SUR LES STAPHYLOCOQUES POLYRÉSISTANTS.
SYNERGIE ÉRYTHROMYCINE-BACITRACINE.**

par Y. CHABBERT et M. VÉRON.

(Institut Pasteur, Laboratoire de l'Hôpital.)

Le terme de Staphylocoques polyrésistants est momentanément comode pour désigner des souches résistantes soit à la totalité, soit à la plus grande partie des antibiotiques les plus utilisés : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines.

Ces souches sont habituellement sensibles aux antibiotiques du groupe de l'érythromycine (érythromycine, carbomycine, spiramycine),

au groupe de la néomycine (néomycine, framycétine) et à la bacitracine.

Elles sont rencontrées avec une certaine fréquence en clinique hospitalière, René Martin et coll. [1] les observent dans 45 p. 100 des cas très graves, et elles posent un problème thérapeutique difficile, pas toujours résolu par l'usage d'un antibiotique isolé comme l'érythromycine.

Plusieurs associations ont été proposées : Johnson et Meleney [2], Teng, Cohen et Meleney [3] montrent l'importance de l'action synergique sur ces staphylocoques de l'association pénicilline + bacitracine. Monnier et Schoenbach [4], Chandler et von der Goltz [5], et, en France, René Martin et coll. [6], Andrieu et coll. [7] ont observé les effets possibles de l'association pénicilline + chloramphénicol par inhibition de la production de la pénicillinase. Ortona et Sorice [8] observent des effets analogues avec pénicilline + érythromycine.

Wise et Spink [9] suggèrent à leur tour d'employer en clinique l'association bacitracine + érythromycine pour les staphylocoques polymésistants.

Nous avons repris l'étude *in vitro* de ces quatre types d'associations sur 7 souches de staphylocoques producteurs de pénicillinase, résistants à la streptomycine et aux tétracyclines, sensibles au chloramphénicol, à l'érythromycine et à la bacitracine.

TECHNIQUE. — Nous avons utilisé la technique en carré proposée par l'un de nous [10] consistant à mélanger des concentrations de deux gammes des antibiotiques à étudier, de façon que chaque concentration de l'un se trouve associée avec la gamme complète des concentrations de l'autre et réciproquement.

Cette étude devant servir de base à un traitement clinique, nous avons étudié, pour chaque antibiotique, 4 concentrations seulement, choisies arbitrairement dans la zone des concentrations humorales, sans tenir compte des points limites, soit :

Pénicilline	10	5	2	et 1 UO/ml
Chloramphénicol	15	7,5	3,7	et 1,8 mcg/ml
Erythromycine	1	0,5	0,25	et 0,12 mcg/ml
Bacitracine	3	1,5	0,7	et 0,3 unités/ml

Nous avons utilisé pour chaque souche deux inoculums, afin de mieux voir l'effet sur la production de pénicillinase : un inoculum fort (environ 10^6 germes/ml), un inoculum faible (10^4).

Nous avons cherché les effets de l'action bactéricide en évaluant le pourcentage des survivants par deux procédés : stries sur gélose [10] et dilutions en gélose.

Cette recherche a été faite après trois temps de contact : six heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures.

RÉSULTATS. — Il nous est apparu que pour qu'une association d'antibiotiques soit intéressante en clinique, il faut non seulement qu'il existe une synergie bactéricide donnant un pourcentage de survivants inférieur à celui observé avec l'antibiotique le plus actif, mais encore que cette synergie aboutisse à un effet bactéricide fort, capable d'abaisser le nombre de survivants à 1 p. 10 000, soit 0,01 p. 100.

1° POURCENTAGE DES EFFETS BACTÉRICIDES FORTS DANS LA ZONE DES CONCENTRATIONS HUMORALES. — Nous avons noté pour les 7 souches, le pourcentage des concentrations ou des combinaisons de concentrations qui ont un pouvoir bactéricide fort par rapport au nombre de concentrations étudiées (4 pour chaque antibiotique isolé et 16 combinaisons pour chaque association), et ceci après vingt-quatre heures de contact.

Les résultats sont assez différents suivant l'importance de l'inoculum.

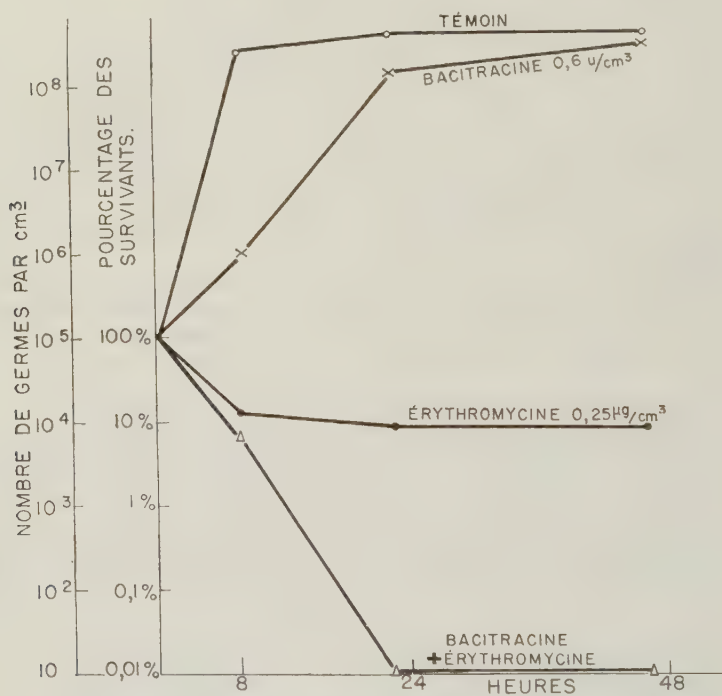


FIG. 1. — Vitesse de l'action bactéricide.

Avec un *inoculum fort*, de l'ordre de 10^6 germes/ml, on obtient les résultats suivants (en p. 100 d'effets bactéricides forts) :

Pénicilline	0	p. 100
Chloramphénicol	0	—
Erythromycine	3	—
Bacitracine	18	—
Pénicilline + Chloramphénicol	4	—
Pénicilline + Erythromycine	46	—
Pénicilline + Bacitracine	51	—
Erythromycine + Bacitracine	74	—

L'association de ces deux derniers antibiotiques donne donc le plus grand nombre de combinaisons ayant un pouvoir bactéricide fort sur une densité importante de germes.

Avec un *inoculum* plus faible, de l'ordre de 10^4 germes/ml, on observe des changements importants dans le comportement respectif des associations.

Les combinaisons de la pénicilline avec la bacitracine ou l'érythromycine donnent un nombre d'effets bactéricides identique à celui des combinaisons érythromycine + bacitracine (80 à 90 p. 100), et l'association pénicilline + chloramphénicol devient nettement plus active, puisque l'on trouve dans 50 p. 100 des cas une forte synergie. Par contre, les antibiotiques isolés restent peu bactéricides sur ces inoculums faibles.

2° EFFETS DE L'ASSOCIATION ÉRYTHROMYCINE + BACITRACINE. — Si l'on envisage le phénomène à des temps variés, on s'aperçoit, au bout de six heures, que la vitesse d'action initiale de l'association érythromycine + bacitracine n'est pas supérieure à celle observée généralement avec la bacitracine, seule ou associée à la pénicilline, ou avec l'érythromycine par exemple. Mais l'action de ces derniers antibiotiques se trouve gênée par des phénomènes secondaires (épuisement, destruction...) : leur action bactéricide se trouve ralentie, stoppée, ou même annulée (croissance secondaire). Il en résulte qu'au bout de vingt-quatre heures, seule, le plus souvent, l'association érythromycine + bacitracine est capable de poursuivre son action bactéricide jusqu'à la destruction totale des survivants (voir fig. 1).

D'autre part, il est intéressant de noter que cette forte action bactéricide peut s'exercer et se maintenir après vingt-quatre et quarante-huit heures avec des doses d'érythromycine et de bacitracine bien inférieures aux taux inhibiteurs des antibiotiques isolés ; ceci ressort du tableau I, qui ne concerne que les survivants après vingt-quatre heures d'action sur la souche étudiée (*Staphylocoque Co...*).

TABLEAU I. — Association érythromycine-bacitracine.

Pourcentage des survivants après 24 heures de contact.

0,01	0,01	0,1	0,1	10	2,2	Erythromycine mcg/cm ³
0,01	0,01	0,1	0,1	100	1,1	
0,01	0,01	0,1	0,1	> 100	0,50	
0,01	0,01	0,1	1	> 100	0,25	
100	> 100	> 100	> 100	+ témoin.		
3	1,5	0,7	0,3			
Bacitracine (unités/ml)						

CONCLUSIONS. — Sur les staphylocoques polyrésistants aux antibiotiques courants, les associations *pénicilline + érythromycine*, *pénicilline + bacitracine* et *bacitracine + érythromycine* sont les plus bactéricides *in vitro*. Cette dernière association doit être préférée lorsque le nombre de germes est élevé : elle semble recommandable comme traite-

ment de secours dans les cas cliniques particulièrement difficiles à traiter, notamment ceux qui possèdent des foyers multiples.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. MARTIN et Y. CHABBERT. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1953, **137**, 241.
- [2] B. A. JOHNSON et F. L. MELENEY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **53**, 42.
- [3] P. TENG, I. COHEN et F. L. MELENEY. *Surg. Gynec. Obst.*, 1951, **92**, 53.
- [4] J. J. MONNIER et E. B. SCHOENBACH. *Antib. et Chemoth.*, 1951, **1**, 472.
- [5] C. A. CHANDLER et E. VON DER GOLTZ. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1951, **91**, 475.
- [6] R. MARTIN, Y. CHABBERT et B. SUREAU. *Presse méd.*, 1952, **61**, 168.
- [7] G. ANDRIEU, J. MONNIER et J. QUERCY. *Rev. Immunol.*, 1953, **17**, 173.
- [8] L. ORTONA et F. SORICE. *Boll. Ist. sier. milan.*, 1953, **32**, 489.
- [9] R. I. WISE et W. W. SPINK. *Antib. Ann.*, 1953, **54**, 322.
- [10] Y. CHABBERT. *Ces Annales*, 1953, **84**, 545 et 1953, **85**, 122.

CROISSANCE MICROBIENNE ET SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

par R. SEIGNEURIN et M.-L. ACHARD.

(*Ecole de plein exercice de Médecine et de Pharmacie
de l'Université de Grenoble. Laboratoire de Microbiologie.*)

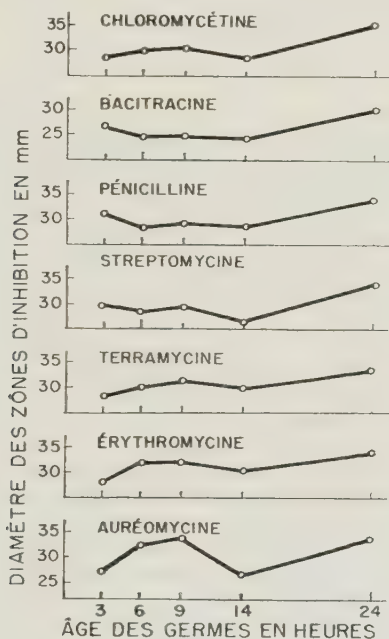
On sait qu'au cours des phases successives de leur croissance, les microbes présentent des variations de leurs caractères ou des modifications de leurs propriétés : dimensions, poids, toxinogénèse, virulence, etc.

Nous nous sommes demandé si la sensibilité d'un germe donné vis-à-vis de certains antibiotiques était un caractère fixe, ou bien si elle variait selon l'âge du germe.

Pour répondre à cette question, nous avons examiné 22 souches de staphylocoque doré, que nous avons isolées de pus divers, anthrax, dermites, pleurésies, ostéites, et même du sang de malades.

Le mode opératoire, toujours le même, fut le suivant : la souche, après isolement chez le malade, est repiquée en bouillon nutritif et portée vingt-quatre heures à 37°. De cette culture de vingt-quatre heures en bouillon, on reporte 4 à 10 millions de germes (comptés sur cellule compte-microbes de Malassez) en un autre tube stérile de 10 ml de bouillon nutritif et placé à 37°. C'est de cette nouvelle culture que l'on part pour les essais suivants. On utilise plusieurs tubes stériles de bouillon que l'on ensemence avec 1 ml de cette culture préparée. Les tubes sont mis à l'étuve et laissés pendant des temps différents. Les temps d'étuve sont en général de trois, six, neuf, quatorze ou seize et vingt-quatre heures. Chaque prélèvement de culture de ces différents âges est ensemencé en nappe homogène,

à raison, dans tous les cas, de 1 million de germes comptés comme indiqué ci-dessus, sur boîte de Petri contenant la gélose spéciale pour détermination de la sensibilité des germes aux antibiotiques, délivrée par l'Institut Pasteur. On dépose sur la gélose ensemencée les disques des différents antibiotiques que l'on veut étudier. Après un jour d'étuve, on mesure le diamètre des zones d'inhibition pour chaque âge de germes et pour chaque antibiotique. Ces souches de staphylocoques dorés ont été étudiées vis-à-vis de la terramycine, de l'auréomycine,



de la pénicilline, de la chloromycétine, de l'érythromycine, de la bacitracine, de la streptomycine.

Nous avons établi une courbe générale moyenne pour chaque antibiotique, résumant les résultats obtenus au cours des différentes expériences. Ces courbes représentent la variation de la sensibilité à chaque antibiotique, mesurée par le diamètre des zones d'inhibition en millimètres, en fonction de l'âge des germes. En abscisses, on a porté l'âge des germes, en heures. En ordonnées, on lit le diamètre des zones d'inhibition en millimètres.

CONCLUSIONS. — Il résulte des courbes ci-jointes que, d'une façon générale, les staphylocoques dorés voient leur sensibilité vis-à-vis de l'auréomycine, de la terramycine et de l'érythromycine, croître de trois à neuf heures, puis diminuer de neuf à quatorze heures, et croître de nouveau de quatorze à vingt-quatre heures (il est probable qu'au delà, le vieillissement augmente la sensibilité).

En ce qui concerne la pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol et la bacitracine, il semble que la sensibilité soit à peu près stationnaire ou diminue jusqu'à quatorze heures, pour ensuite croître de quatorze à vingt-quatre heures.

En résumé, la sensibilité aux sept antibiotiques étudiés, des staphylocoques virulents (récemment isolés des malades), varie selon l'âge de ces germes : stationnaire pendant les quatorze premières heures, ou présentant un maximum vers neuf heures, c'est-à-dire à la fin de la phase exponentielle, elle est à son minimum vers quatorze heures et elle augmente ensuite au cours des heures suivantes.

RECHERCHES SUR LA NATURE CHIMIQUE DES AGGLUTINOGÈNES STAPHYLOCOCCIQUES

par J. PILLET, M. ROUYER et B. ORTA.

(*Institut Pasteur. Annexe de Garches.*)

Dans le but de préciser la nature chimique des agglutinogènes staphylococciques, nous avons plus particulièrement étudié, dans ce travail, l'action d'une diastase protéolytique, la papaïne, sur ces agglutinogènes.

La meilleure méthode d'évaluation quantitative des agglutinogènes paraissant être actuellement la mesure de l'absorption des agglutinines d'un antisérum par un antigène convenable, nous avons utilisé cette technique en employant trois types d'antigènes : 1° les staphylocoques tués et desséchés ; 2° un extrait de ces mêmes staphylocoques obtenu par chauffage ; 3° un extrait sonique.

Nous considérons la méthode d'absorption des agglutinines comme plus sûre, pour l'instant, que l'évaluation directe de la quantité d'agglutinogènes déduite des taux d'agglutination, car si cette technique peut donner des résultats intéressants (P. Oeding [1]), les divers traitements auxquels on soumet les germes entraînent souvent des agglutinations spontanées et, par ailleurs, le mécanisme de l'agglutination étant mal connu, on doit considérer comme au moins théoriquement possible un défaut de proportionnalité entre le taux d'agglutination et la quantité d'agglutinogènes existant à la surface du germe étudié.

Nous avons utilisé, presque uniquement dans cette étude, la souche de staphylocoque type I comme source d'antigène, des recherches antérieures [2] nous ayant montré cette souche comme particulièrement active du point de vue de l'absorption des agglutinines.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — *Antigènes.* — Souche type I : a) Germes tués et desséchés. — La technique de préparation des germes secs a été décrite antérieurement [2].

b) Extrait obtenu par chauffage. — Des quantités variables de germes secs sont émulsionnées en eau physiologique et chauffées

quinze minutes à 100°. Après centrifugation, le surnageant est filtré sur bougie L3 et on teste alors son activité antigénique.

c) Extrait sonique. — Les germes provenant de huit boîtes de Roux (cultures de dix-huit heures) sont lavés, émulsionnés en eau physiologique (60 cm³) et ensuite soumis quatre heures à l'action d'ondes vibratoires de 10 Kc/sec, produites par magnétostriction (Raytheon). Cette opération s'effectue dans une cuve en acier inoxydable refroidie par une forte circulation d'eau maintenant la température aux environs de 20°. Après centrifugation, le surnageant est stérilisé sur bougie L3 et utilisé soit directement, soit après lyophilisation.

Anticorps. — Nous avons utilisé le sérum anti-6 qui s'absorbe facilement, mais présente généralement après l'absorption des agglutinines résiduelles anti-3.

Action de la papaïne. — Une série d'essais préliminaires nous a montré que la solution de papaïne utilisée (papaïne Vaillant, concentration 5 p. 100) avait une activité suffisante lorsqu'on l'utilisait dans les conditions suivantes : temps de contact, une heure ; température, 37°, pH 8. Après action de la papaïne on l'inactive par chauffage quinze minutes à 100°. Les différents témoins (germes + eau physiologique, germes + papaïne inactivée) ont été soumis à un chauffage identique.

Absorptions et agglutinations. — Ces deux tests ont été pratiqués selon les techniques habituelles [2, 3] : absorption, trente minutes à 37° ; agglutinations sur lame avec lecture après quinze minutes d'agitation. Chacun des sérums utilisés a été testé avec les 9 souches de staphylocoques types [3].

RÉSULTATS. — *Action de la papaïne sur le pouvoir absorbant des staphylocoques tués et desséchés.* — Le tableau I résume les résultats obtenus dans une série d'absorptions où les staphylocoques tués et secs utilisés comme antigène ont été diversement traités avant que soit testé leur pouvoir absorbant.

Dans ces différentes expériences, le poids de germes (180 mg), le volume (5 cm³) et la dilution 1/50 du sérum sont restés constants.

TABLEAU I.

Sérum anti 6	Souches types								
	I	II	III	4	5	6	7	8	9
Avant absorption	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Après absorption par (A)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Après absorption par (B)	0	0	+-	0	0	++++	0	0	0
Après absorption par (C)	0	0	+-	0	0	++++	0	0	0

(A), germes traités par la papaïne.

(B), germes non traités.

(C), germes traités par la papaïne inactivée.

Ces résultats montrent qu'après traitement par la papaïne les staphylocoques ont perdu la presque totalité de leur pouvoir absorbant. Afin de préciser la grandeur de cette perte, l'expérience a été reprise en utilisant du sérum dilué au 1/500 et en additionnant les échantillons de sérum de quantités variables de germes traités ou non par la papaïne.

Le résultat le plus caractéristique est celui de l'absorption comparée de deux sérums (5 cm³ au 1/500) par 1,8 mg de germes I non traités d'une part, et 180 mg de germes I traités par la papaïne d'autre part.

Dans ces conditions, les absorptions constatées sur l'un et l'autre sérum sont très comparables, ce qui permet de conclure qu'après action de la papaïne, la perte du pouvoir absorbant des staphylocoques peut être considérée comme pratiquement totale.

La fraction absorbante pouvant être passée en solution, l'étude des surnageants obtenus après les différents traitements (A, B et C) a été effectuée et nous a permis de constater l'existence d'une fraction absorbante très réduite mais caractéristique dans les surnageants de (B) et de (C), c'est-à-dire dans les surnageants n'ayant pas été en contact avec la papaïne active. Dans ce dernier, au contraire, aucun pouvoir absorbant n'a pu être décelé.

Ces résultats montrent que sous l'action du chauffage : quinze minutes à 100° (traitement auquel ont été soumis chacun des échantillons), une faible partie du pouvoir absorbant des staphylocoques passe en solution. Cette fraction passant à travers les bougies L3, nous avons pu sur le liquide filtré préciser certaines de ses propriétés.

Cette étude a été effectuée parallèlement sur le filtrat d'un extrait sonique de staphylocoques dans lequel nous avons pu mettre en évidence, de la même manière, l'existence de substances neutralisant les agglutinines. Dans l'extrait sonique la concentration de ces substances reste faible mais néanmoins supérieure à celle constatée dans le filtrat provenant de l'extrait obtenu par chauffage.

Les propriétés de ces deux filtrats étant qualitativement comparables, nous les étudierons simultanément.

Propriétés des extraits solubles. — Filtration : La fraction neutralisante passe à travers les bougies L3.

Résistance à la chaleur : Cette fraction est relativement résistante à la chaleur ; un chauffage de quinze minutes à 100° ne diminue que très peu son activité, laquelle ne disparaît pas complètement après chauffage une heure à 100°.

Spécificité : La faible teneur en substances actives oblige à utiliser des dilutions de sérum élevées, 1/500 à 1/1 000, ou à lyophiliser l'extrait afin d'obtenir une solution suffisamment concentrée. Dans ces conditions, l'absorption de l'antisérum 6 par un extrait de germes I filtré donne des résultats qualitativement identiques à ceux obtenus par les germes totaux.

Action de la papaïne sur ces extraits : Après une heure de contact à 37° avec de la papaïne à 5 p. 100, les extraits perdent la propriété de neutraliser les agglutinines alors qu'ils la conservent si le contact est effectué dans les mêmes conditions avec de la papaïne préalablement inactivée.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — On peut tirer des résultats obtenus dans ce travail les conclusions suivantes.

Les staphylocoques soumis à l'action d'une diastase protéolytique, la papaïne, perdent la presque totalité (99 p. 100) de leur pouvoir absorbant vis-à-vis des agglutinines staphylococciques.

Ce pouvoir absorbant ne peut être retrouvé dans le liquide surnageant lorsque les germes ont été traités par la papaïne active.

On retrouve, par contre, une fraction faible mais caractéristique du pouvoir absorbant dans le liquide surnageant des germes témoins ou des germes soumis à l'action de la papaïne inactivée. (Dans ces deux cas les germes ont subi un chauffage de quinze minutes à 100° en vue de les soumettre à un traitement identique à celui des germes traités par la papaïne active.)

Une fraction soluble douée de propriétés neutralisantes analogues à celles de la fraction obtenue par chauffage mais plus active peut, d'autre part, être obtenue en soumettant une émulsion de staphylocoques à l'action d'ondes vibratoires obtenues par magnétostriction.

Ces deux types de fractions solubles, capables de neutraliser spécifiquement des quantités d'agglutinines staphylococciques non négligeables, sont filtrables sur bougies L3, relativement résistantes à la chaleur, et perdent toute activité lorsqu'on les traite par la papaïne.

La quantité d'agglutinines absorbées pouvant être considérée comme en rapport direct avec la quantité d'agglutinogènes présente à la surface du germe étudié, ces résultats indiquent que les agglutinogènes staphylococciques sont de nature protéique, ou possèdent tout au moins une fraction protéique dont la destruction entraîne la perte de toute activité immunologique décelable *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. OEDING. *Acta Path. Micr. Scand.*, 1953, **33**, 312.
- [2] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. *Ces Annales*, 1952, **82**, 465.
- [3] J. PILLET et B. ORTA. *Ces Annales*, 1953, **84**, 420.

ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ DES REJETONS DANS LES INFECTIONS RÉCURRENTIELLES CHEZ LE COBAYE, LE RAT ET LA SOURIS

par A. VAISMAN et A. HAMELIN.

(Institut Alfred Fournier.)

Dans des travaux antérieurs [1, 2, 3, 4], avec C. Levaditi, nous avons montré que les sérums de souris, de rats et de cobayes, infectés par *Borrelia duttoni* ou *B. hispanica*, contenaient des immobilisines spécifiques capables d'agir sur ces parasites. Elles apparaissent rapidement

et leur taux augmente progressivement au cours de l'évolution de la spirillose pour diminuer ensuite, à une période tardive de la maladie. L'activité anti-spirillaire de ces anticorps est à la fois immobilisante et lytique, et, fait important, la présence d'immobilisines dans le sérum n'exclut pas la persistance du virus pendant la phase inapparente de la spirillose. On sait, en effet, que le virus se conserve dans le cerveau au cours de cette période, puisque le transfert d'un tel cerveau à des souris neuves leur confère la parasitose. De plus, ces spirilles se montrent résistants aux immobilisines sériques, leur résistance étant susceptible d'être transmise pendant un certain nombre de transferts, par voie héréditaire.

Les anticorps immobilisants sont rigoureusement *spécifiques* de la souche infectante et leur présence est coexistante d'un état réfractaire de l'animal à une nouvelle inoculation de la souche homologue. De même que l'activité immobilisante de ces anticorps est exclusivement homologue, de même l'état réfractaire du sujet ne joue que vis-à-vis d'une réinoculation de spirochètes de même espèce, et ne révèle aucune immunité hétérologue.

Nous nous sommes demandé quel serait le comportement des *rejets* du point de vue de la teneur de leur sérum en anticorps, de la présence éventuelle de virus dans leur cerveau et de leur résistance à une inoculation d'épreuve.

TECHNIQUE. — Chaque portée de souris, rats ou cobayes est divisée en deux lots. L'un est sacrifié, le sang étant prélevé pour recherche des anticorps et le cerveau inoculé à des souris neuves pour l'épreuve de virulence. L'autre est inoculé avec des spirilles de souche homologue, épreuve de réceptivité.

TABLEAU I. — Souche *hispanica*.

rats	N ^o	âge	anticorps	virulence du cerveau	épreuve de réceptivité
	41	24 jours	0	0	—
	42	24	0	0	—
	43	24	0	0	—
	44	24	—	—	+
	45	24	—	—	+
	46	24	—	—	+
	47	25	—	—	+
	48	25	—	—	+
	49	25	—	—	+
Souris	51	20	0	0	—
	52	20	0	0	—
	53	20	0	0	—
	54	26	—	—	+
	55	26	—	—	+
	56	38	—	—	+
	57	38	—	—	+
	58	38	—	—	+
	59	39	—	—	+
	60	39	—	—	+
	61	39	—	—	+

0, négatif ; +, positif ; —, pas fait.

Les investigations ont porté sur des souriceaux nés de mères infectées depuis seize à cent quatre vingt huit jours, sur des ratons dont l'infection maternelle s'échelonne entre vingt-neuf et quatre-vingts jours et sur des cobayes de mères infectées depuis cinq cent quatre vingt quinze à six cent seize jours.

Le tableau I condense les résultats de nos essais avec la souche *hispanica*.

Il résulte de ce tableau que, pour la souche *hispanica*, le sérum de tous les cobayes et de tous les ratons contient des anticorps immobilisants et lysants, bien que leur cerveau, de même qu'aucun autre organe, ne contienne pas de virus. La présence d'anticorps va de pair avec la résistance à l'inoculation d'épreuve. Au contraire, pour les souriceaux, chez lesquels nous avons constaté l'absence d'immobilisines sériques, l'épreuve de réceptivité s'est montrée toujours positive. Leur cerveau, comme celui des petits cobayes et des ratons, ne contient pas le virus.

Le tableau II donne les résultats obtenus avec la souche *duttoni*. Nos expériences, réalisées avec la souche *duttoni* sur des rats et sur

TABLEAU II. — Souche *duttoni*.

Cobayes N°	âge	anticorps	virulence du cerveau	épreuve de réceptivité
1	1 jour	+	0	-
2	7	+	0	-
3	11	-	-	0
Rats 11	15	+	0	-
12	15	+	0	-
13	15	-	-	0
14	15	-	-	0
15	44	+	0	-
16	44	+	0	-
17	44	+	0	-
18	48	-	-	0
19	48	-	-	0
20	51	+	0	-
21	51	+	0	-
22	51	+	0	-
23	51	+	0	-
24	51	-	-	0
25	51	-	-	0
26	58	-	-	0
27	67	-	-	0
28	67	-	-	0
29	67	-	-	0
Souris 31	22	-	-	+
32	22	-	-	+
33	22	0	0	-
34	24	0	0	-
35	24	-	-	+
36	46	-	-	+
37	46	0	0	-
38	48	-	-	+
39	48	-	-	+
40	46	0	0	-

0, négatif ; +, positif ; —, pas fait.

des souris, montrent que les rejetons de ces deux espèces animales se comportent de la même manière, c'est-à-dire : *absence d'anticorps* et, par suite, *épreuve de réceptivité positive*. Ici aussi, comme pour la souche *hispanica*, le cerveau est avirulent.

CONCLUSION. — Il ressort de ces expériences que, pour la souche *hispanica*, les rejetons des rats et cobayes présentent dans leur sang des anticorps anti-spirillaires, coexistants avec un état de résistance à une inoculation d'épreuve de la souche homologe. Les souriceaux, au contraire, ne présentent pas d'anticorps sériques et sont réceptifs.

Pour la souche *duttoni*, dans les deux espèces animales étudiées, rats et souris, pas de transmission d'anticorps aux rejetons et, par conséquence, épreuve de réceptivité positive.

L'ensemble de ces constatations démontre que, dans l'infection récurrentielle expérimentale du cobaye, rat et souris, il n'y a pas transmission congénitale du virus, mais pour les espèces animales où il y a passage d'anticorps aux rejetons, la résistance de ceux-ci à une inoculation d'épreuve est de règle, mettant en évidence la relation entre les anticorps immobilisants et l'immunité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN. Ces *Annales*, 1952, **83**, 256.
- [2] C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN. Ces *Annales*, 1952, **83**, 437.
- [3] A. VAISMAN, A. HAMELIN et C. LEVADITI. Ces *Annales*, 1953, **84**, 774.
- [4] A. VAISMAN et A. HAMELIN. Ces *Annales*, 1954, **86**, 107.

SOLUBILISATION PAR VOIE BIOCHIMIQUE DE L'ARSENIC LIÉ AU FER DANS LES SOLS

par HENRI-RENÉ OLIVIER et MARCEL LE PEINTRE (*).

(Laboratoire de Recherches de la Société Thermale de La Bourboule.)

R. Betremieux [1] a parfaitement décrit la solubilisation du fer des sols sous l'influence des processus microbiens qui modifient le milieu ambiant en le rendant réducteur. L'un de nous [2] a de même établi que l'arsenic, lié au fer dans les roches sédimentaires, est solubilisé par l'action de réducteurs chimiques.

Le but de notre travail est de montrer que, dans les sols, l'arsenic lié au fer passe en solution, dès qu'un aliment énergétique est présent en quantité suffisante pour permettre le développement de la microflore réductrice.

(*) Travail effectué avec l'aide technique de M^{lles} Th. Binda et M. Bertin.

EXPÉRIENCE I. — Trois colonnes sont montées, sur bourre de coton de verre recouverte de deux épaisseurs de filtre Chardin, avec 200 g d'un mélange de terre arable (25 p) et de sable de Fontainebleau (75 p), ensemencée ou non par un *Clostridium* et percolée par une même quantité de liquide. L'écoulement de l'effluent est libre ; la température est celle du laboratoire au mois de juillet. Teneur en As des matériaux utilisés : terre, 5,2 mg/kg ; sable, 1,75 mg/kg ; B.VF-réd. dilué au 1/4, 50 µg/litre.

Colonnes	1	2	3
Germes	0	<i>Cl. sporogenes</i>	0
Milieux	eau	B. VF-réd.	B. VF-réd.
Effluent (11° au 17° jour) : pH .	6,5	7	7
As .	traces	89 µg	64 µg

EXPÉRIENCE II. — Quatre colonnes sont montées de la même façon que la précédente, avec un mélange de tuffeau (25 p) et de sable (75 p). Le tuffeau contient 2,5 mg/kg d'arsenic. L'écoulement lent des liquides de percolation n'est permis que toutes les vingt-quatre ou quarante-huit heures, le sommet de la colonne restant toujours immergé, température 22°. Durée de l'expérience : vingt-quatre jours.

Colonnes	1	3	4	5
Poids	350	800	800	400
Germes	0	<i>Cl. sporogenes</i>	<i>Cl. bifementans</i>	0
<i>Milieu :</i>				
Nature	Eau-dist.	VF-réd.	VF-réd.	VF-réd.
Volume en cm ³	550	1 200	1 200	590
As en µg	0	30	30	14,75
<i>Effluent :</i>				
Volume en cm ³	495	1 018	939	547
pH max. et min.	7,5-7	7	7	7-6,5
Eh min. en mV	+ 150	— 10	— 10	+ 110
<i>As :</i>				
Dissous en µg	51,4	250	302,5	95,7
Dissous en µg/l	102	245	322	174
Dissous en µg/kg terre .	147	312	378	239
<i>Fe (1) :</i>				
Dissous en mg	0,710	24,7	24	9,5
Dissous en mg/l	1,4	24	25	17
Dissous en mg/kg terre .	2.	31	30	24

(1) La présence du Fe II a été vérifiée qualitativement par le 2,2' dipyridyl en solution alcoolique.

EXPÉRIENCE III. — Dans un bocal A, on place : 1 l de bouillon VF-réductose dilué au 1/4, contenant 25 µg/l d'As, et 300 g de tuffeau, on ensemence avec du *Cl. sporogenes*. Dans le bouillon plonge un sac

de dialyse en cellophane contenant de l'eau distillée bouillie. Tous les liquides sont maintenus sous huile de paraffine. Etuve à 37°.

JOURS	BOCAL A				ALLONGE B			
	Dialysat		Milieu		Dialysat		Milieu	
	As	Fe	As	Fe	As	Fe	As	Fe
9°	142		100	2	136	5	153	3,5
12°	170	3	150	3,5	315	9,5	246	5
15°	40	5	130	2,5	212	8	278	3,5

As en $\mu\text{g/l}$; Fe en mg/l .

Dans une allonge B, on introduit un sac à dialyse épais, en cellophane, contenant 300 g de tuffeau et 1 l de bouillon VF-réductose dilué au 3/4 contenant 75 $\mu\text{g/l}$ d'As, le tout estensemencé avec du *Cl. sporogenes*. Autour de ce sac, l'allonge est remplie d'eau distillée bouillie. Tous les liquides sont recouverts d'huile de paraffine. Etuve à 37°.

Pour confirmer, s'il en était besoin, que, dans cette expérience d'immersion du tuffeau, la solubilisation de l'As est due à l'action microbienne, nous avons laissé digérer cette roche pulvérisée dans de l'eau distillée; nous n'avons dissous que des traces d'arsenic. Nous avons, en outre, réalisé l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE IV. — Deux colonnes sont montées avec du tuffeau d'Anjou et lixiviées, la première avec de l'eau distillée, la deuxième (ensemencée avec *Cl. sporogenes*) avec du bouillon VF-réductose dilué au 1/4. L'eau ne dissout, à partir du tuffeau, que des traces d'arsenic, environ 12 $\mu\text{g/l}$; le bouillon VF, qui cultive, dissout l'As à la concentration de 210 $\mu\text{g/l}$. Durée de l'expérience, vingt et un jours. Température, 22°. Il est tenu compte de l'As apporté par le bouillon VF.

Les expériences I, II, III et IV démontrent que, même lorsque les roches ne contiennent pas d'As hydrosoluble, qu'il s'agisse de lixiviation ou d'immersion, l'arsenic des sols passe en solution.

Dans l'expérience II, on voit que l'arsenic et le fer sont mobilisés d'une façon parallèle, en rapport avec les variations du potentiel Redox des milieux, et cela avec une approximation suffisante, eu égard à la complexité des phénomènes. Si, en effet, on calcule le rapport As dissous-As hydrosoluble

$\frac{\text{Fe dissous}}{\text{As dissous-As hydrosoluble}} \times 100$, on obtient pour la colonne 3, 0,5; colonne 4, 0,8, et colonne 5, 0,43.

L'expérience III précise qu'ils sont l'un et l'autre dialysables, et par conséquent, dissous et non colloïdaux.

Ainsi, la fermentation anaérobie des substances organiques, en solubilisant, par réduction, le fer du sol, provoque le passage en solution de l'arsenic lié à ce métal.

BIBLIOGRAPHIE

- [2] M. LE PEINTRE. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **299**, 359.
[4] R. BETREMIEUX. *Ann. Agron.*, 1951, **3**, 193.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DU SÉRUM DE CYNOCÉPHALE

par S. ARBOUYS, J. FINE et A. EYQUEM.

(*Institut Pasteur. Service d'Hématologie et des Groupes Sanguins.*)

La microélectrophorèse sur papier, par sa simplicité d'appareillage, sa rapidité d'exécution, la faible quantité de sérum qu'elle nécessite, constitue une technique permettant l'exploration, par des examens répétés, des variations pathologiques en clinique humaine et, de la même manière, l'établissement des constantes biologiques animales dans le domaine expérimental de la pathologie comparée.

Cette méthode revêt encore un grand intérêt, lorsqu'on s'adresse aux animaux habituels de laboratoire chez lesquels le prélèvement de grandes quantités de sang est impossible. C'est ainsi que, dans une précédente communication, nous avons étudié les constantes électrophorétiques chez les rongeurs, en particulier chez le rat, la souris, le mérion, ainsi que quelques variations au cours de syndromes expérimentaux.

Nous avons cru intéressant d'étudier ensuite les valeurs des différentes fractions protéiques chez les singes, animaux fréquemment utilisés en virologie.

Nous avons étudié le sérum de 34 cynocéphales sains, appartenant au genre *Papio*, de la singerie de l'Institut Pasteur de Paris.

MÉTHODE EMPLOYÉE. — Les valeurs obtenues par électrophorèse ne sont pas toujours comparables et les chiffres publiés diffèrent souvent. Ceci est dû à ce que, si le principe de séparation reste le même, la réalisation diffère du point de vue pratique (phase liquide ou papier, tampons de pH différents, modes de coloration, évaluation quantitative par photométrie ou interférométrie). *On ne peut tenir compte que des résultats obtenus par des méthodes semblables*, qu'il s'agisse de comparer des chiffres d'individus normaux entre eux, ou de rechercher les variations de telle ou telle fraction traduisant une modification pathologique. Si l'on compare alors les valeurs obtenues par la même méthode, on s'aperçoit que les divers auteurs trouvent des chiffres très semblables.

Nous avons utilisé un appareil de séparation construit suivant le principe de Grassmann, Hannig et Knedel. Bandes de papier Schleicher et Schull n° 2043 a. Tampon véronal/véronal sodé de pH 8,6. Force

ionique, 0,1. Courant continu de 160 volts, 1,25 milliampère par bande pendant six heures ou 0,25 milliampère pendant treize heures.

Le volume de sérum déposé sur la bande de papier est inversement proportionnel à la quantité de protéines totales, lorsque ce taux est différent de la normale. Coloration à l'amidoschwartz 10 B, décoloration par des bains successifs de méthanol acétique. Photométrie directe sur la bande rendue transparente par de l'huile de paraffine. Les valeurs des densités optiques sont portées millimètre par millimètre sur du papier millimétré, suivant des coordonnées linéaires.

On planimètre les différentes fractions isolées par la méthode des parallèles et on calcule le pourcentage de chacune d'elles par rapport aux protéines totales.

RÉSULTATS. — Notre étude a porté sur le sérum de 34 cynocéphales. Les valeurs moyennes obtenues sont résumées dans le tableau I, chaque fraction exprimée en pourcentage étant accompagnée de l'écart moyen type.

Il est intéressant de les comparer aux chiffres obtenus chez l'homme par l'un de nous et J. Groulade.

TABLEAU I.

ESPÈCE	NOMBRE	ALBUMINE p. 100	α_1 p. 100	α_2 p. 100	$\alpha_1 + \alpha_2$ p. 100	β p. 100	γ p. 100
Homme . . .	52	$60,2 \pm 3,9$	$3,3 \pm 0,9$	$7,6 \pm 1,8$		$12,4 \pm 2,3$	$16,5 \pm 2,6$
Cynocéphale .	34	$42,9 \pm 3,7$				$12,2 \pm 1,5$	$27,2 \pm 2,8$
	21		$3,15 \pm 0,5$	$12 \pm 1,6$			
	13				$14,7 \pm 1,9$		

On peut les rapprocher également des valeurs déjà publiées par Deutsch et Goodloe en 1945, qui, étudiant par électrophorèse en phase liquide à pH 8,6, après dialyse, le sérum de 3 hommes et de 3 singes, ont obtenu les chiffres suivants :

TABLEAU II. — (Deutsch et Goodloe, 1945).

ESPÈCE	NOMBRE	ALBUMINE	α_1	α_2	α_3	β	Φ	γ
Homme .	3	$59,6 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,5$	$8,8 \pm 0,4$		$11 \pm 0,1$	4,8	$9,1 \pm 0,2$
Singe . .	3	$50 \pm 0,5$	$5,9 \pm 1$	$5,2 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,5$	$16,4 \pm 0,9$	8,4	$9 \pm 0,4$

Ces tableaux permettent de voir que le sérum de cynocéphale renferme proportionnellement moins d'albumine que le sérum humain, en relation avec une teneur en globuline-gamma plus élevée chez le singe que chez l'homme.

Busson, Trapet et Lecocq, étudiant par électrophorèse à l'aide de

deux méthodes différentes (interférométrie et absorption dans l'ultra-violet) le sérum de plusieurs centaines d'Africains sains de Dakar et comparant les chiffres obtenus pour les différentes fractions protéiques avec celles obtenues chez les Européens sains de Dakar, montrèrent que, chez les Africains, la concentration du sérum en albumine est inférieure, et celle de la globuline gamma supérieure à celles de l'Européen.

Il est, d'autre part, intéressant de noter qu'en saison fraîche, le sérum des Européens habitant Dakar a les mêmes constantes que le sérum des Européens de la métropole. Busson et coll. ont soulevé l'hypothèse du rôle des facteurs nutritionnels et climatiques sur ces variations.

Des constatations analogues ont été signalées par Le Gac, Sice et Viollier, qui, étudiant les protéines du sérum des Noirs de l'Oubangui, ont trouvé les moyennes suivantes : A, 42,2 p. 100 ; globuline α_1 , 6,2 p. 100 ; globuline α_2 , 8,4 p. 100 ; globuline β , 9,1 p. 100 ; globuline γ , 26,1 p. 100. Ces auteurs attribuent l'augmentation des globulines gamma à un déséquilibre alimentaire et aux nombreuses affections intestinales ou hépatiques rencontrées sous ces climats.

Il nous a paru logique d'essayer de rapprocher ces faits des conclusions tirées de la comparaison des sérums de singe et d'homme.

On peut aussi concevoir avec vraisemblance que les variations pathologiques des fractions protéiques du cynocéphale puissent se superposer à celles rencontrées chez l'homme.

C'est ainsi qu'à l'occasion de l'étude du sérum de cynocéphale atteint d'une pneumopathie aiguë, nous avons trouvé, tout comme chez l'homme, une augmentation assez importante des globulines α : albumines, 31,5 p. 100 ; globulines $\alpha_1 + \alpha_2$, 28,2 p. 100 ; globulines β , 16,1 p. 100 ; globulines γ , 24,2 p. 100.

BIBLIOGRAPHIE

- BUSSON, TRAPET et LECOCQ. *Bull. Méd. A. O. F.*, 1954, **41**, 11.
H. F. DEUTSCH et M. B. GOODLOE. *J. biol. Chem.*, 1954, **461**, 1.
J. M. FINE, M^{me} VINCON-ALRIO, A. EYQUEM et J. GROULADE. *Presse médicale*, 1954, **62**, 1043.
W. GRASSMANN, K. HANNIG et M. KNEDEL. *Deutsch med. Wschr.*, 1951, **76**, 333.
P. LE GAC, A. SICE et G. VIOLLIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 108.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Fixation et transport des antibiotiques par les hématies, par R. SEIGNEURIN, M.-L. ACHARD et R. MAGNEN.

L'équipement des macrophages en phosphomonoestérases, par P. BRUYET, A. DELAUNAY et M^{me} Ch. MEIGNIEN.

Contribution à l'étude des phyto-agglutinines et leur rôle au cours des syndromes hémolytiques expérimentaux, par A. EYQUEM, M. SAINT-PAUL et M^{me} J. MAGNIN.

LIVRES REÇUS

Transfusion sanguine et actualités hématologiques. 1^{er} Congrès National des Transfusions sanguines de France et des pays de langue française, Alger, avril 1953. — Publié sous la direction du professeur Ed. Benhamou et du D^r And. Albou. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1953. Prix : 4 000 frs.

C'était une gageure de rendre attrayante la présentation d'un important ouvrage groupant les rapports et communications présentés au 1^{er} Congrès National de Transfusion Sanguine de France et des pays de langue française, tenu à Alger en 1953. Cet ouvrage est d'un intérêt certain pour le spécialiste aussi bien que pour le médecin, le chirurgien ou l'accoucheur. C'est une véritable mise au point d'un certain nombre de questions d'une actualité brûlante dans le domaine de la Transfusion, de l'Immuno-Hématologie et de l'Hématologie.

Sont successivement envisagés les aspects sociaux et militaires de la transfusion sanguine, ainsi que tous les problèmes posés par les besoins de sang, puis les questions strictement sérologiques avec le dépistage des sangs dangereux, ainsi que l'étude des syndromes imputables à une auto-immunisation. Sont aussi étudiées différentes techniques : voies d'introduction du sang, méthodes de séparation des éléments figurés du sang et fractionnement du plasma.

Dans la deuxième partie sont présentés les différents aspects cliniques et thérapeutiques relatifs à la pathologie des globules rouges, des globules blancs, des plaquettes ou des organes du système hématopoïétique.

La personnalité des rapporteurs et la présentation heureuse réalisée par le professeur Benhamou et le D^r Albou font de ce livre un véritable traité.

A. E.

A. E. Mourant. — *The distribution of the human blood groups.* Blackwell scientific publications, édit., Oxford, 1954. Prix : 42 shillings.

Cet ouvrage, attendu depuis longtemps par les anthropologistes et les généticiens, présente en effet la somme des résultats des nombreuses enquêtes effectuées en grande partie par l'auteur et ses collaborateurs et constitue par là même un volume du plus haut intérêt.

Après un rapide exposé des systèmes de groupes sanguins A B O, Rh, M N S s, Lewis, P, Lutheran, Kell, Duffy, Kidd, l'auteur analyse la valeur anthropologique d'autres caractères génétiques, tels que la couleur des yeux ou des cheveux et l'aptitude à reconnaître le goût

de la phénylthiocarbamide ou l'odeur de l'acide hydrocyanique. Il s'attache ensuite aux anomalies héréditaires.

Les chapitres suivants sont consacrés à la répartition des groupes sanguins en Europe centrale et septentrionale divisée en Région Ouest à faible fréquence de sujets de groupe A et Région Nord-Ouest à fréquence élevée de sujets de groupe O.

La région méditerranéenne, l'Afrique du Sud et le Sahara, l'Asie, l'Indonésie et l'Australie, ainsi que les populations aborigènes du Sud et du Nord de l'Amérique et enfin les Esquimaux font l'objet d'une centaine de pages.

Sont rapidement passés en revue les antigènes érythrocytaires retrouvés dans les os et les tissus de l'homme et des animaux, notamment les primates.

L'essai de synthèse est d'un vif intérêt par l'exposé des facteurs contrôlant la distribution génique, l'opposition entre le système A B O et les autres systèmes, ainsi que par l'origine et l'évolution des groupes sanguins.

Les techniques et méthodes d'étude, de même que les calculs des fréquences géniques sont présentés avec une grande clarté.

L'ensemble des 40 cartes et tables de fréquence des antigènes de groupes sanguins constitue une illustration résumant les résultats de nombreux travaux.

Une bibliographie de 1 700 références complète très heureusement cet excellent ouvrage, dont il convient de souligner la rédaction claire, les critiques impartiales et la présentation louable.

A. E.

R. R. Race and Ruth Sanger. — *Blood groups in man*, 2^e édit., Blackwell scientific publications, édit., Oxford, 1954, Prix : 30 shillings.

La première édition de ce livre était un instrument de travail indispensable aux laboratoires d'étude des groupes sanguins. La nouvelle présentation, revue et augmentée, constitue une mise au point inestimable, dont il convient de remercier les auteurs. On ne peut qu'admirer la clarté de l'exposé et la présentation qui n'est jamais lassante pour le lecteur.

Les 21 chapitres sont successivement consacrés aux différents systèmes et à leur hérédité.

A B O avec les antigènes H et O.

La sécrétion salivaire des antigènes A B O.

Le groupe M N S s, avec les antigènes Hunter et Henshaw.

Le système P.

Les antigènes Rh et notamment C^w, D^v, c^v, C^u, C^x, E^v et f le dernier d'entre eux.

Les combinaisons chromosomiques rares : — D —, Cde, C^wdE.

La spécificité des anticorps anti-Rh et les méthodes à utiliser.

Le groupe Lutheran et ses relations avec le groupe Lewis. L'effet de dosage du gène Lu^a et son développement.

Les systèmes Kell, Lewis, Duffy, Kidd.

Les antigènes rares ou très fréquents.

Les méthodes d'étude et de détermination du type des anticorps.

Le rôle des antigènes de groupes sanguins et les problèmes de parenté.

Les rapports entre groupes sanguins et maladies.

L'étude des liaisons entre les gènes de groupes sanguins et les autres gènes.

Les auteurs qui ont personnellement contribué aux progrès effectués dans ce domaine étaient tout qualifiés pour rédiger cet excellent manuel, dont tout généticien, sérologiste ou anthropologiste est déjà en possession.

A. E.

Bernard Maupin. — *Les plaquettes sanguines de l'homme*, 1 vol., 272 p., Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1954.

Il est difficile, à notre époque, d'avoir une connaissance complète dans tous les domaines. Aussi sont accueillis avec gratitude les ouvrages comme celui publié par le médecin-commandant Maupin. Cette œuvre est d'un spécialiste qui jouit d'une expérience unique et d'une connaissance profonde de tout ce qui se rapporte à ce sujet.

Après un exposé critique des méthodes de séparation des plaquettes, on voit se dessiner les tendances actuelles basées sur la connaissance de l'action nocive des surfaces mouillantes et des anticoagulants classiques.

La cytochimie, la chimie et le métabolisme des plaquettes ont été l'objet des études de l'auteur qui résume ses conclusions.

On trouve, de plus, une étude physiologique et un résumé très clair et très complet des notions d'immunologie. Après un rapide aperçu des variations physiologiques et pathologiques, ainsi que du rôle des plaquettes en pathologie, l'auteur traite de l'utilité et des modalités des transfusions de plaquettes. Ces transfusions peuvent être faites par transfusion directe à l'aide de seringues siliconées ou par transfusion de plaquettes concentrées séparées du sang normal, soit immédiatement après séparation, soit après conservation.

Cet ouvrage sera vivement apprécié des hématologistes et des hommes de laboratoire.

La thèse de M. Maupin avait été brièvement analysée dans ces *Annales*, 1954, 87, 356.

A. E.

A Vannotti. — *Porphyrins. Their biological and chemical importance.*

1 vol., 258 p., 10 fig., 15 pl. hors texte, Hilger and Watts Ltd. édit., Londres, 1954, Prix : 50 shillings.

L'auteur, professeur à l'Université de Lausanne, avait publié en 1937 chez Springer, à Berlin, une monographie sous le titre « Porphyrine und Porphyrinkrankheiten ». Lorsqu'en 1952 les éditeurs de Londres lui demandèrent de traduire son ouvrage en anglais, il préféra, étant donné les progrès considérables réalisés dans ce domaine depuis quinze ans, écrire de nouveau son livre. Cette nouvelle rédaction fut faite en français et traduite en anglais par le professeur Rimington de Londres. On connaît l'importance capitale des porphyrines dans la structure de l'hémoglobine et des hémines intracellulaires, qui jouent

un rôle primordial dans la régulation de la chimie cellulaire. C'est ainsi que l'auteur en est arrivé à l'étude du métabolisme du fer et des enzymes respiratoires de la cellule. Il passe en revue également le métabolisme pathologique des porphyrines chez l'homme et les maladies qu'entraînent les perturbations du métabolisme de ces pigments. Chaque chapitre comporte une bibliographie assez importante, qui a été réunie à la fin du volume.

H. T.

S. A. Waksman. — *Perspectives and horizons in microbiology*. 1 vol., 220 p., Rutgers University Press, New Brunswick (New Jersey), U. S. A., édit., 1954. Prix : \$ 3,50.

Il s'agit d'un Symposium organisé par Waksman, et qui s'est tenu à l'Institut de Microbiologie de la Rutgers University. Il avait pour but « d'étudier les aspects actuels et, dans certains cas, les aspects à venir, de la microbiologie ». Le volume est divisé en trois parties : Le microbe en tant que système vivant. Le métabolisme des microorganismes. Les microorganismes et les formes de vie supérieures. Il comprend les articles de 13 collaborateurs : H. A. Barker, B. D. Davis, H. Eagle, J. W. Foster, M. Heidelberger, F. L. Horsfall, L. W. Jones, A. J. Kluyver, J. Lederberg, A. Lwoff, D. H. Peterson, R. L. Starkey, W. W. Umbreit, C. B. van Niel, S. A. Waksman et P. Wilson.

H. T.

H. J. Parish. — *Antisera, toxoids, vaccines and tuberculin in prophylaxis and treatment*. 3^e édit., 1 vol., 227 p., E. et S. Livingstone, édit., Edinbourg et Londres, 1954. Prix : 21 shillings.

Cette troisième édition reproduit les précédentes avec quelques mises au point que nécessitaient les progrès réalisés depuis la seconde, qui ne remontait cependant qu'à trois ans. Les différences avec les éditions précédentes sont donc peu importantes. La sérothérapie est devenue surtout une médication d'appoint, qui s'ajoute aux vaccins. La diphtérie est maintenant rare, mais les parents doivent savoir que s'ils laissent leurs enfants sans protection, la maladie redeviendra dangereuse. Il y a actuellement des vaccins contre la coqueluche. Le BCG joue un rôle important dans la prophylaxie de la tuberculose. Les derniers chapitres du volume sont consacrés à l'immunisation contre les maladies à rickettsies et à virus.

H. T.

Hans Schmidt. — *Fortschritte der Serologie*, n° 15, p. 897-960, Verlag Dr Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1954.

Le quinzième fascicule de ce Traité concerne successivement la phagocytose, son mécanisme, son rôle dans l'infection, ainsi que les accélérateurs et les inhibiteurs.

Après un bref exposé des connaissances sérologiques sur le liquide céphalo-rachidien, l'auteur présente le résumé complet et très moderne de nos connaissances sur les tumeurs envisagées du point de vue immunologique, ainsi que l'explication immunogénétique des échecs de transplantations d'organes et les essais d'induction d'immunité anti-tumorale et du traitement immunologique du cancer.

A. E.

A. L. Romanoff et A. J. Romanoff. — *The avian egg*. 1 vol., 918 p., 424 fig., John Wiley and sons édit., New York, 1949. Prix : \$ 16.

Les auteurs, qui ont consacré à l'étude de l'œuf des oiseaux une activité qui s'est étendue sur plus de vingt-cinq ans, ont réuni dans ce volume tous les faits connus sur la question. Ces faits étaient jusqu'alors épars dans de nombreuses publications où l'on ne pouvait les retrouver qu'au prix de très grandes difficultés. Le livre s'adresse donc aussi bien au biologiste qu'à l'éleveur ou au diététicien. Il est divisé en trois parties. La première étudie la biologie et la structure de l'œuf : la ponte et tout ce qui s'y rapporte (hérédité, nutrition, influence des saisons, etc.), la morphologie et les caractéristiques extérieures de l'œuf, ses divers constituants (coquille, membranes, jaune...), la formation de l'œuf dans l'organisme des oiseaux, et enfin les anomalies externes et internes qui peuvent l'atteindre. La seconde partie traite de la constitution chimique et physico-chimique de l'œuf, ainsi que de ses propriétés biologiques (hormones, enzymes, bactériologie de l'œuf, etc.). La troisième concerne la valeur et l'utilité de l'œuf pour l'homme, et d'abord sa valeur alimentaire (valeur nutritive de l'œuf entier, de l'albumine, du jaune, valeur énergétique...), sa conservation et les modifications qu'il peut subir en vieillissant, et enfin son emploi industriel non seulement dans la fabrication des pâtes alimentaires ou de la biscuiterie, mais aussi son utilisation dans certaines peintures, dans divers produits synthétiques, etc. Enfin, on sait l'importance qu'a prise, au cours de ces dernières années, l'œuf de poule dans les recherches biologiques et, en particulier, dans la culture des virus, et le rôle que joue cette méthode dans la préparation de plusieurs vaccins, beaucoup moins onéreuse ainsi qu'avec les techniques faisant intervenir des animaux.

Ce livre, abondamment illustré, comprend une liste de 2 600 références bibliographiques, mais c'est en réalité près de 15 000 publications que les auteurs ont dû dépouiller pour réaliser leur œuvre. C'est un ouvrage fondamental et capital sur la question, et qui doit avoir sa place dans toutes les bibliothèques scientifiques.

H. T.

O. Gunther. — *Neue Antigentabelle der Salmonellagruppe (Kauffmann-White Schema). Ihre praktische und theoretische Bedeutung*. 1 fascicule, 17 p., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, édit., 1954. Prix : D. M. 3.

Tableau des antigènes H et O pour 308 types de salmonelles, précédé de quelques pages décrivant brièvement les recherches qui ont permis l'établissement du schéma de Kauffmann-White et quelques-unes des recherches les plus récentes sur la génétique des *Salmonellae*.

H. T.

Le Gérant : G. Masson.